

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE ESTATÍSTICA E INFORMÁTICA
PROGRAMA DE MESTRADO EM BIOMETRIA

ANÁLISE ESTATÍSTICA DE ÍNDICES MORFOMÉTRICOS
E DIMENSÃO FRACTAL DA VASCULARIZAÇÃO DA
RETINA HUMANA.

ANTÔNIO JOSÉ DE OLIVEIRA

Recife, Fevereiro de 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE ESTATÍSTICA E INFORMÁTICA
PROGRAMA DE MESTRADO EM BIOMETRIA

ANÁLISE ESTATÍSTICA DE ÍNDICES MORFOMÉTRICOS
E DIMENSÃO FRACTAL DA VASCULARIZAÇÃO DA
RETINA HUMANA.

ANTÔNIO JOSÉ DE OLIVEIRA

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Biometria da
Universidade Federal Rural de
Pernambuco, para obtenção do título
de Mestre em Biometria

RECIFE – PERNAMBUCO – BRASIL
FEVEREIRO – 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE ESTATÍSTICA E INFORMÁTICA
PROGRAMA DE MESTRADO EM BIOMETRIA

ANÁLISE ESTATÍSTICA DE ÍNDICES MORFOMÉTRICOS
E DIMENSÃO FRACTAL DA VASCULARIZAÇÃO DA
RETINA HUMANA.

ANTÔNIO JOSÉ DE OLIVEIRA

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Biometria da
Universidade Federal Rural de
Pernambuco, para obtenção do título
de Mestre em Biometria

**Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora em 23 de
fevereiro de 2006.**

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Romildo de Albuquerque Nogueira-U FRPE

CO-ORIENTADOR

Prof. Dr. Catão Temístocles Freitas Barbosa-UFPE

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Fabrício Bezerra de Sá-UFRPE

Prof^a. Dr^a. Cláudia Helena Dezotti-UFRPE

Prof^a. Dr^a. Rosângela Paula Lessa-UFRPE

DEDICATÓRIA

A minha Família, a saber: meus filhos Sérgio Henrique de Oliveira e Pedro Henrique de Oliveira e a minha querida esposa Gilvaneide Ferreira de Oliveira, pelo carinho, apoio e compreensão na ausência do convívio familiar, ocorrida durante o desenrolar deste trabalho.

MENSAGEM

Aos que passam pela nossa vida

Cada um que passa em nossa vida
passa sozinho...

Porque cada pessoa é única para nós,
e nenhuma substitui a outra...

Cada um que passa em nossa vida
passa sozinho,
mas não vai só...

Cada um que passa em nossa vida
leva um pouco de nós mesmos
e nos deixa um pouco de si mesmo...

Há os que levam muito,
mas não há os que não levam nada...

Há os que deixam muito,
mas não há os que não deixam nada...

Esta é a mais bela realidade da vida,
a prova tremenda de que cada um é importante
e que ninguém se aproxima do outro por acaso...

Saint-Exuperry

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por tudo, independentemente do que recebo, pois se Deus não realiza o meu desejo mais profundo num determinado momento é porque ele tem algo melhor para me oferecer.

Aos meus pais, José Otaviano de Oliveira e Maria Lindalva de Oliveira, que mesmo sem compreender muito o significado desta etapa da minha vida, souberam me apoiar em todos os momentos. As minhas irmãs, Maria de Lourdes de Macedo e Maria da Soledade de Araújo que deram sua parcela de contribuição mesmo que de forma indireta, durante a minha estada neste mestrado.

A meu orientador e amigo Prof. Dr. Romildo de Albuquerque Nogueira pela paciência, dedicação e profissionalismo dispensada na orientação deste trabalho.

Ao Professor Dr. Eufrásio de Souza Santos, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biometria por sua dedicação e atenção aos alunos deste programa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biometria da Universidade Federal Rural de Pernambuco pela oportunidade de crescimento pessoal e intelectual.

Aos professores pela dedicação e amizade, os quais, cito nominalmente: Prof^ª. Dr^ª. Maria Adélia, Prof. Dr. Borko Stosic, Prof^ª. Dr^ª Claudia Dezotti, Prof. Dr. Eufrásio Santos, Prof. Gauss Cordeiro, Prof^ª. Dr^ª. Maria do Socorro, Prof. Dr. Paulo de Paula e o Prof. Dr. Romildo Nogueira.

Ao Oftalmologista, Dr. Marcelo Mendonça do Hospital das Clínicas da UFPE, pela colaboração na nossa pesquisa.

Ao graduando de Engenharia da Computação da UFPE, Williams Thiago, por sua valiosa contribuição na parte computacional deste trabalho.

A graduanda de Medicina Veterinária, Ana Carolina Bione Kunicki, pela colaboração no desenvolvimento experimental deste trabalho.

As colegas de trabalho, Dayse Pitta, Eliane Câmara Lima e Marília Vilela pelas orientações no que se refere ao conhecimento das línguas inglesa e portuguesa, que se fizeram tanto presente no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas da turma de 2004, os quais cito nominalmente: Ady Marinho Bezerra, Antônio Lopes Pessoa, Arundo Nunes da Silva Junior, Carlos André Batista, Cícero Carlos Ramos de Brito, Dâmocles Aurélio Nascimento da Silva, Fabio Cavalcanti Pereira, Franklin Tupinambá Paes de Andrade Vieira, Heliovânio Torres Bandeira Herbetes de Hollanda Cordeiro, Ilzes Celi Cruz de Santana, Leonardo Mendes de Lima Junior e Sérgio de Sá Leitão Paiva Junior, pelos momentos de apreensão e alegria durante nossa formação.

Ao mestre, Paulo Duarte, pelas suas orientações de programação em C que foi tão valiosa neste trabalho.

Ao Prof. Dr. George Ximenes, pelas suas sábias palavras de apoio e incentivo nos momentos em que estivemos em contato nas idas e vindas ao laboratório.

Aos companheiros do LABTEC: Bruno Mendes Tenório, Edbhergue Ventura Lola Costa, Hellen White Moraes e Silva, Jeine Emanuele Santos da Silva e Walter Santos, pelo convívio e amizade, durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos secretários do Programa de Pós-Graduação em Biometria, Josemar Maria Teixeira Neves, Adalmeres Vasconcelos Cavalcanti e Marco Antônio Gomes dos Santos, que foram bastante atenciosos e dedicados, durante minha permanência neste mestrado.

SUMÁRIO

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Aspectos clínicos e fisiológico da vascularização da retina.....	2
2.2 Fundo do olho e a geometria fractal.....	3
2.3 Métodos para o cálculo de dimensão fractal.....	4
2.4 Descritores de forma.....	6
3. OBJETIVOS.....	10
3.1. Objetivo Geral.....	10
3.2. Objetivos específicos:.....	10
4. MATERIAL E MÉTODO.....	11
4.1. Segmentação dos vasos retinianos.....	11
4.2. Descritores de forma.....	13
4.3. Dimensão fractal.....	14
4.4. Estatística.....	17
5. RESULTADO.....	22
5.1. Descritores de forma.....	22
5.2. Dimensões Fractais.....	27
6. DISCUSSÃO.....	33
7. CONCLUSÕES.....	36
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
9. ANEXOS.....	40
9.1. Programas em C (Flatfile).....	40
9.2. Resumos estendidos publicados.....	48
9.2.1. V JEPEX 2005 (UFRPE).....	48
9.2.2. V ERMAC (UNIVERSIDADE POTIGUAR-RN).....	52

RESUMO

A análise de imagens fotográficas do fundo do olho tem tornado possível à obtenção de diagnósticos precisos para diversas enfermidades que envolvem a vascularização da retina humana. A análise morfométrica e a dimensão fractal são propostas no presente trabalho como métodos capazes de parametrizar esse processo vascular. A segmentação manual dos vasos da retina, realizada nesse trabalho, permitiu a obtenção de imagens bem definidas desses vasos, que possibilitaram a sua parametrização através de cálculos de índices de formas e dimensão fractal. Os índices de formas, perímetro e área usados para descrever a geometria das vênulas tributárias da veia central da retina humana, diferiram significativamente nas retinas normal e com retinopatia diabética não-proliferativa, podendo dessa maneira, serem usados para diferenciar uma retina normal de outra doente. No entanto, os índices circularidade e retangularidade das vênulas tributárias da veia central da retina não mostraram diferenças significativas entre os estados normal e doente da retina, sendo, portanto, parâmetros inadequados para discriminar alterações vasculares da retina. A dimensão fractal do processo de vascularização da retina humana nos estados normal e com retinopatia diabética não-proliferativa diferiram significativamente entre si, independente do método usado no cálculo dessa dimensão. Portanto, a dimensão fractal é um parâmetro que pode ser usado para diferenciar estados normal e patológico da retina humana.

ABSTRACT

The analysis of the fundus of the eye photographic images has permitted the obtaining of an accurate diagnoses for several diseases related to the human retina vascularization. This work proposes the morphometric analysis and the fractal dimension as methods capable to parameterize the retinal vascular process. A hand made segmentation of the retina vessels done in this work allowed the obtaining of high defined image of the retina vessels. These images made possible the parametrization of the retina vessels using the shape indexes and fractal dimension. The shape indexes like perimeter, area, circularity and rectangularity were used to describe the shape of the tributary venules of the human retina central vein. The statistical analysis showed that both the perimeter and the area of the tributary venules of the central vein of human retina are significantly different between normal and with non proliferative diabetes individuals. But the parameter circularity and rectangularity of these tributary venules were not significantly different. Then, the parameters perimeter and area can be used to discriminate the normal from the ill retina, while the parameters circularity and rectangularity are inadequate to distinguish them. The fractal dimension of the vascularization human retina, in the normal and disease conditions, differed significantly between themselves, independently of the method applied to calculate it. Therefore, the fractal dimension is a parameter which can be used to distinguish the normal from the disease state of the human retina.

1. INTRODUÇÃO

Alterações vasculares da retina, tem sido usada pelos oftalmologistas para estabelecer diagnóstico de várias doenças do olho humano. A análise detalhada de imagens fotográficas do fundo do olho tem tornado possível à obtenção de diagnósticos cada vez mais precisos e permitido ao clínico acompanhar o desenvolvimento dessas enfermidades que acometem nossa retina.

A descrição de parâmetros quantitativos que possa facilitar o diagnóstico de doenças da retina humana é, portanto, de grande interesse para clínica oftalmológica.

A quantificação de fenômenos por meio de modelos matemáticos e métodos estatísticos é uma prática estabelecida em diversos ramos da biologia, como a genética, ecologia, imunologia e fisiologia (MONTEIRO e REIS, 1999). Dentre os métodos matemáticos pode-se destacar a morfometria geométrica, que visa quantificar a variação de forma biológica ao longo da evolução de um processo em observação. Com o desenvolvimento da análise de processamento de imagens, surgiram métodos geométricos cada vez mais avançados para descrever formas das estruturas biológicas (ROHLF e BOOKSTEIN, 1990). No entanto, as formas de algumas estruturas são tão complexas que uma descrição morfométrica se torna impossível e nesses casos a geometria fractal tem sido proposta na busca de identificar padrões nessas estruturas irregulares construídas pela natureza.

Realizar mensuração do contorno das vênulas tributárias da veia central da retina humana e analisar a complexidade do processo vascular, visando auxiliar no diagnóstico clínico, é o objetivo desse estudo. Índices morfométricos, tais como comprimento, área, circularidade e retangularidade serão usados para analisar o contorno das vênulas tributárias da veia central nas imagens digitalizadas do fundo de olho. A análise de padrões de complexidade da vascularização da retina humana será realizada através da determinação da dimensão fractal da imagem de fundo de olho.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos clínicos e fisiológicos da vascularização da retina.

Várias doenças acometem o fundo do olho, principalmente a retina e o plexo vascular. O exame de fundo do olho tem sido usado na rotina clínica para identificar diferentes patologias. A possibilidade de digitalização da imagem do fundo de olho e a aplicação de novos métodos matemáticos e algoritmos computacionais têm permitido uma maior precisão em diagnósticos de doenças que dependem do processo de vascularização da retina, como neovascularizações, degenerações de vasos e outras (STADES *et al* 1999).

A irrigação da retina se dá através da artéria oftálmica, um ramo da artéria carótida interna, que é responsável pelo suprimento sanguíneo arterial da retina enquanto o sangue venoso da retina é transportado através da veia central (NOER, 1992). A retina também recebe suprimento sanguíneo dos vasos coroidianos e da artéria central da retina. Os vasos coroidianos suprem as células receptoras (cones e bastonetes), que estão na camada mais externa da retina. A artéria central da retina, que é um ramo da artéria oftálmica, ramifica-se nas artérias terminais dentro das camadas retinianas mais internas. Estes ramos suprem as células ganglionares, as células bipolares e as fibras nervosas (VAUGHAN *et al.*, 1997).

A distribuição dos vasos retinianos pode ser observada através da imagem de fundo de olho. A cor desta imagem depende de vários fatores como a concentração do sangue nos grandes vasos coroidianos, a densidade do pigmento do epitélio pigmentar retiniano e dos melanócitos da coróide e do tipo e intensidade da fonte de luz.

Os vasos retinianos se distribuem na retina com uma geometria bastante complexa. No entanto, uma descrição geométrica deste processo vascular é de grande importância para um diagnóstico preciso de várias doenças que acometem a vascularização da retina humana. Estes complexos padrões apresentados pelos vasos retinianos são bem modelados pela geometria fractal, dado que as medidas fractais são bastante aplicadas em diferentes problemas acerca de processamento de imagem e reconhecimento de padrões (COSTA e CESAR, 2001).

2.2 Fundo de olho e a geometria fractal

Um modelo para o desenvolvimento da vascularização da retina foi proposto por KRETZER *et al.* (1984) e KRETZER & HITTNER (1988), que sugerem a existência de uma relação entre o desenvolvimento dos vasos sanguíneos e a maturação dos fotoreceptores. Durante seu estágio de desenvolvimento os vasos consomem progressivamente mais oxigênio, decrescendo o oxigênio disponível para a retina interna. As células fusiformes migratórias na retina interna avascular sentem a diminuição da concentração de oxigênio e liberam fatores angiogênicos. Estes se difundem no plano da retina e estimulam o crescimento de novos vasos. O decréscimo no fluxo de oxigênio transretinianos vindo da vascularização coroidal é compensado por uma nova fonte vascular na retina interna. Portanto, a difusão dos fatores angiogênicos é o processo físico responsável pelo desenvolvimento dos padrões de vasos retinianos. Uma análise fractal desse processo de vascularização da retina em humanos mostrou que o valor da dimensão fractal é o mesmo que o encontrado para um processo de difusão limitada por agregação (DLA), (Figura 1), ou seja, $D \approx 1,7$ (FAMILY *et al.*, 1989; MASTERS, 2004; ARAÚJO *et al.*, 2003). O DLA é obtido através de um algoritmo computacional que consiste em liberar-se uma partícula de um ponto escolhido aleatoriamente num círculo e que é adsorvida por outra partícula (semente) que se encontra no seu centro. Quando a partícula é adsorvida, uma nova partícula é liberada de uma posição escolhida randomicamente no círculo. Este processo vai sendo repetido um grande número de vezes e um DLA vai sendo formado no interior do círculo (SANDER, 1986; WITTEN & CATES, 1986; MEAKIN, 1986).

Redes vasculares de pessoas normais e portadoras de diabetes ou outras retinopatias diferem nos valores da dimensão fractal D . A determinação desse parâmetro tem uma grande importância na aplicação do diagnóstico precoce e não invasivo de anomalias oftalmológicas (AVAKIAN *et al.*, 2002) . Os vasos retinianos têm sido estudados extensamente uma vez que eles podem ser facilmente visualizados no exame oftalmológico (GOMES *et al.*, 1993).

O entendimento dos fenômenos da natureza está invariavelmente associado à realização de medidas de alguns parâmetros e à interpretação do

significado dos resultados obtidos. A teoria dos fractais nos diz que estes resultados experimentais dependem da precisão dos instrumentos utilizados na realização das medidas dos parâmetros em estudo (GOMES *et al.*, 1993).

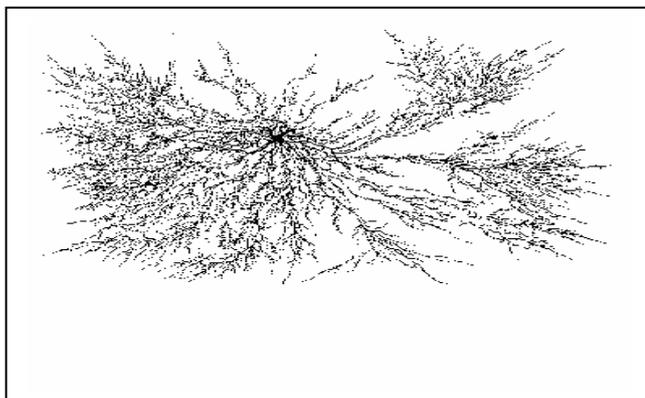


Figura 1. Imagem digitalizada de uma difusão limitada por agregação (DLA).

A palavra “fractal” foi cunhada por Mandelbrot . Ele reuniu, criou e popularizou uma grande coleção de tais objetos. Esses objetos são caracterizados por suas propriedades que são: (i) a auto-similaridade, a qual significa que partes de um objeto ou processo é semelhante ao objeto ou ao processo todo; (ii) a dependência de escala (scaling), que significa dizer que a medida da grandeza depende da escala com que ela foi medida; (iii) dimensão fractal, a qual provêm de uma descrição quantitativa da auto-similaridade e da dependência de escala e (iv) as propriedades estatísticas anômalas das grandezas fractais (BASSINTHWAITGHT *et al.*, 1994; MANDELBROT, 1983).

2.3 Métodos para o cálculo de dimensão fractal.

A dimensão fractal pode ser calculada por diferentes métodos, porém, neste trabalho serão usados somente três deles, o método da dimensão de contagem por caixas (box-counting), o método da dimensão de informação e o método da dimensão massa-raio.

O método da dimensão fractal por contagem por caixas (box-counting) consiste em cobrir-se o objeto fractal com $N(r)$ caixas de maneira que elas contenham pelo menos um ponto do objeto fractal (Figura 6).

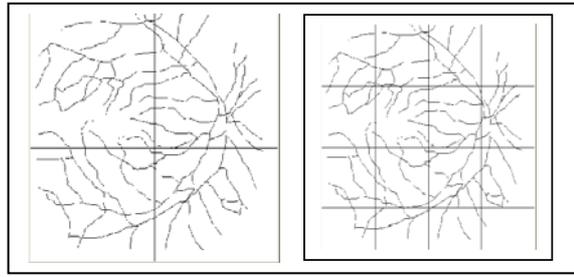


Figura 6. Imagem segmentada de uma retina, sendo submetida ao cálculo da dimensão contagem por caixas, com caixa 2X2 e 4X4.

Modifica-se o tamanho das caixas e repete-se o procedimento. Após repetir-se várias vezes o procedimento traça-se um gráfico do logaritmo de $N(r)$ em função do logaritmo de $1/r$ e determina-se a dimensão fractal pelo ângulo de inclinação do gráfico (NUSSENZVEIG, 1990; BASSINGTHWAIGHT *et al.*, 1994).

Assim como a contagem de caixa, a dimensão de informação é uma dimensão de cobertura (Equação 1), onde objeto fractal é coberto por caixas de diferentes raios r e é definida pela expressão:

$$d = \lim_{r \rightarrow 0} \left[\frac{(S(r + \varepsilon) - S(r))}{\log(r + \varepsilon) - \log r} \right], \quad (1)$$

onde $S(r) = - \lim_{N \rightarrow \infty} \sum_{i=1}^{N(d)} m_i \log m_i$, é denominada entropia de Kolmogorov.

$N(d)$ é o número de caixas e $m_i = MI / M$ sendo MI o número de pixels na i -ésima caixa e M é o número total de pixels do objeto fractal. Diferente do que ocorre na dimensão de box-counting que atribui pesos iguais a todas as caixas que contenha pelo menos um pixel na dimensão de informação, atribuem-se pesos diferentes, de tal maneira que aquelas que tem um maior número de pixels pesam mais do que aquelas que tem um menor número de pixels. A dimensão de informação é obtida pelo coeficiente angular de um gráfico da entropia de Kolmogorov versus o logaritmo dos lados das caixas usadas para cobrir o objeto fractal.

A dimensão de massa-raio é obtida construindo-se círculos de diferentes raios localizados no centro de massa da região de maior densidade do objeto fractal e calculando-se o número de pixels (massa) dentro de cada um desses círculos.

Para um objeto fractal, a massa M (pixel) escala com o r (raio) dos círculos através da seguinte expressão: $M(r) \sim r^D$, onde, M é a massa, r é o raio e D é a dimensão de massa raio (VICSEK, 1991).

Para obtermos o valor da dimensão massa-raio linearizamos a equação

$$M(r) = r^D \quad (2),$$

aplicando o logaritmo em ambos os lados da expressão 2, o coeficiente angular da reta depois da linearização é a dimensão massa-raio.

2.4 Descritores de Formas

Descritores de formas tais como comprimento, área, circularidade e retangularidade têm sido usados na literatura especializada para descrever quantitativamente formas de estruturas biológicas (DUARTE-NETO, 2005) e aqui serão usados para analisar o contorno das vênulas tributárias da veia central nas imagens digitalizadas do fundo de olho.

O comprimento é o somatório de todos os pixels que compõem as vênulas tributárias da veia central da retina (Equação 3) que separa a parte branca da parte preta da imagem (Figura 2) e que pode ser representada pela expressão matemática que se segue:

$$C(x) = \sum_{ij} x_{ij} \quad (3)$$

com: $x_{ij} = 1$ se $x \in C$ e $x_{ij} = 0$ se $x \notin C$, onde $C(x)$ é o comprimento, x_{ij} são os elementos da matriz que compõem a borda ou contorno (DUARTE-NETO, 2005).

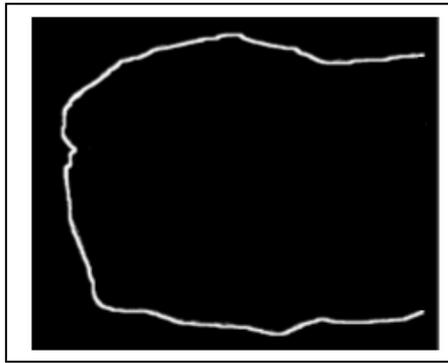


Figura 2. Imagem da segmentação das vênulas tributárias superior e inferior da veia central da retina humana em branco com fundo da imagem preto.

A área é definida como o somatório de todos os pixels (Equação 4) que compõem a matriz da imagem das vênulas tributárias da veia central da retina humana, ou seja, a parte interna mais a borda (Figura 3) e que pode ser representada pela expressão a seguir :

$$A(x) = \sum_{ij} x_{ij} \quad (4)$$

com: $x_{ij} = 1$ se $x \in A$ e $x_{ij} = 0$ se $x \notin A$, onde $A(x)$ é a área e x_{ij} são os elementos da matriz que compõem toda parte interna mais a borda ou contorno (DUARTE-NETO, 2005).

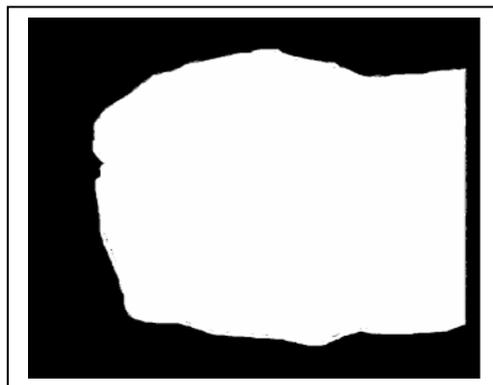


Figura 3. Imagem do contorno e toda região interna das vênulas tributárias da veia central da retina humana em branco com fundo da imagem preto, pronta para o cálculo da área.

A circularidade tem como objetivo medir a similaridade de uma estrutura a um círculo (Figura 4) e pode ser representada pela seguinte expressão:

$$CI = \frac{P^2}{A} \quad (5)$$

onde, CI é a circularidade (Equação 5), P é o perímetro e A é a área total da Imagem, vale ressaltar que a circularidade perfeita ocorre quando seu valor é 4π (DUARTE-NETO, 2005).

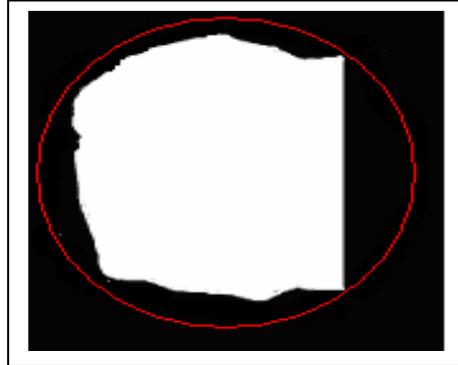


Figura 4. Imagem do contorno e toda região interna das vênulas tributárias da veia central da retina humana, sendo submetida ao cálculo da circularidade.

A retangularidade consiste em estabelecer a razão entre a área total da imagem das vênulas tributárias da retina humana (parte em branco) pelo menor retângulo no qual seja possível encaixar perfeitamente a imagem (Figura 5).

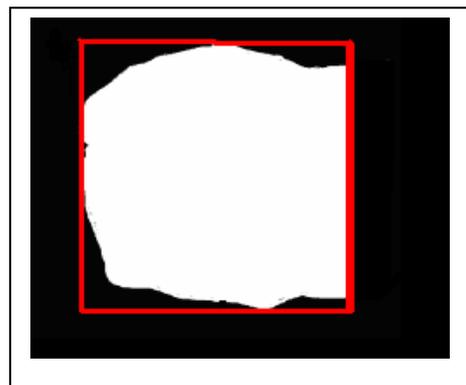


Figura 5. Imagem do contorno e toda região interna das vênulas tributárias da veia central da retina humana, sendo submetida ao cálculo da retangularidade.

Observe-se que a retangularidade é uma grandeza adimensional (Equação 6), pois estabelece-se uma razão entre duas áreas, a área total e a área do menor retângulo que envolve a imagem de interesse;

Vale lembrar que a retangularidade perfeita acontece quando essa razão é unitária. Formalmente, pode-se representar a retangularidade pela expressão:

$$RE = \frac{A}{C_{\min} \cdot H_{\min}} \quad (6)$$

onde, RE é a retangularidade, A é a área de toda parte em branco, C_{\min} é o comprimento mínimo e H_{\min} é a altura mínima do retângulo que circunscreve a imagem (DUARTE-NETO, 2005).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Parametrizar o processo de vascularização da retina humana visando o diagnóstico assistido por computador de doenças vasculares da retina humana.

3.2 Objetivos específicos:

- Desenvolver métodos computacionais que possibilitem identificar e diferenciar os vasos retinianos nas imagens digitalizadas obtidas de fundo de olho humano (segmentação);

-Aplicar índices de formas, tais como comprimento, área, circularidade e retangularidade, para descrever a geometria das porções paramaculares das vênulas tributárias da veia central da retina da retina humana no estado normal e com retinopatia diabética não-proliferativa;

- Usar a dimensão fractal como parâmetro para descrição da vascularização da retina humana nos seus estados normal e com retinopatia diabética não-proliferativa.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1 Segmentação dos vasos retinianos

Foram usadas em nossa análise trinta retinografias em pacientes normais e vinte e quatro em pacientes com retinopatia diabética não proliferativa gentilmente cedidas pelo Dr. Marcelo Mendonça do Hospital das Clínicas/UFPE. Todas as imagens foram obtidas num ângulo de 60 graus e nos pacientes normais a fóvea foi centralizada. As imagens normais têm dimensões 936 X 936 pixel e as vinte quatro doentes dimensão 640 X 480 pixel, todas em formato Jpeg (Figura 7).

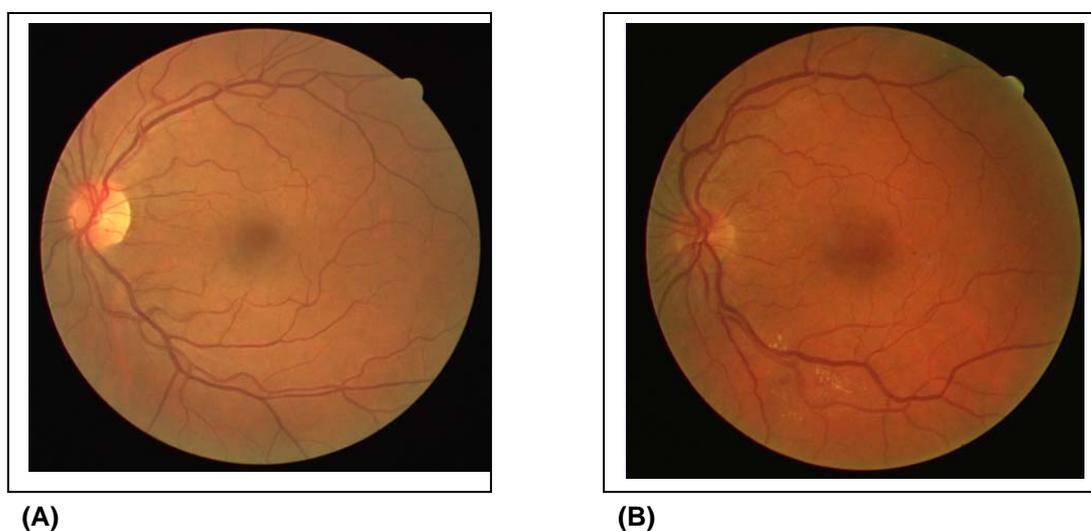


Figura 7. Retinografias de dois pacientes, um normal (A) e o outro com retinopatia diabética não proliferativa (B).

Nessas imagens foram realizadas segmentações tanto das vênulas tributárias da veia central da retina como de todo processo vascular. A segmentação das vênulas tributárias da veia central tem como objetivo aplicar nessa imagem segmentada alguns índices de formas na busca de diferenciar uma retina normal de outra com alguma alteração patológica, através da observação da forma das mesmas.

Para segmentar as imagens desenvolveu-se a seguinte rotina: *Abre-se* a imagem (Figura 8 A) selecionada no programa Paint da Microsoft e *usa-se* lápis na cor branca para cobrir toda extensão das vênulas tributárias da veia central possível de ser visualizada (observe na imagem mostrada na figura 8 B que toda extensão das vênulas tributárias da veia central está em branco e o restante da imagem em cinza claro).

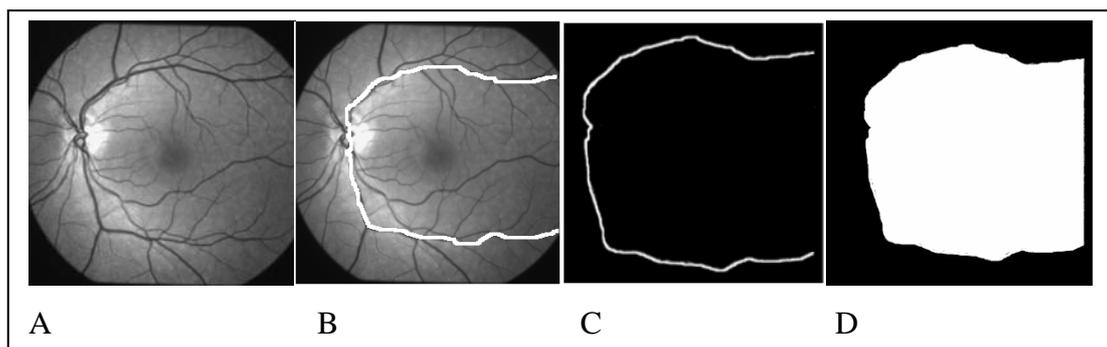


Figura 08. (A) Imagem digitalizada da retina de um paciente oftalmicamente normal, (B) segmentação das vênulas tributárias da veia central da retina, (C) mudança de cores da imagem para preto e branco e (D) preenchimento da parte interna para o cálculo da área.

Em seguida seleciona-se na barra de menu *imagem* na guia *atributos* e selecionamos em cor *preta e branca*. Este procedimento tornará a região segmentada branca e o restante da imagem preta (Figura 8 C). Nesse instante a imagem está pronta para se fazer à leitura do índice de forma comprimento no programa Flatfile. Posteriormente, ligam-se suas extremidades de maneira a formar uma figura fechada e se preenche toda parte interna da figura usando-se a ferramenta do Paint da Microsoft denominada de *preencher com cores*, seleciona-se a cor branca (Figura 8 D), para que se possa, usando o programa Flatlife, calcular os outros índices de forma tais como a área, a circularidade e a retangularidade.

Para se fazer à segmentação total, visando o cálculo da dimensão fractal, deve-se proceder da seguinte maneira: *Abre-se* a imagem da retinografia em seu estágio inicial (Figura 9 A) no programa Paint da Microsoft e *usa-se* o lápis para preencher toda extensão da vascularização da retina. Observe na Figura 9 B as vênulas e arteríolas estão na cor branca e o restante da imagem em cinza claro. Em seguida escolhe-se na barra de menu *imagem* na guia *atributos* selecionamos em *cores* a opção *preta e branca*. Este procedimento tornará a região segmentada (vênulas e arteríolas) branca e o restante na cor preta (Figura 9 C).

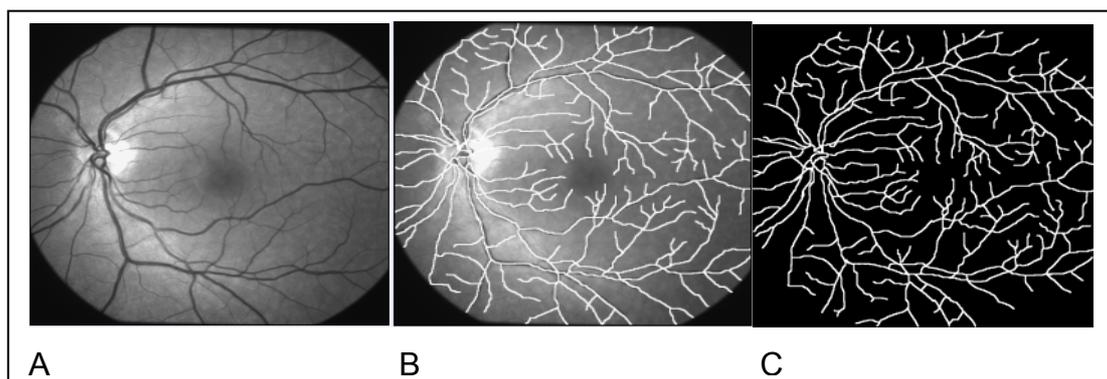


Figura 09. (A) Retinografia de uma paciente normal, (B) Imagem da vascularização da retina parcialmente segmentada e (C) Imagem dos vasos retinianos pronta para os cálculos das dimensões fractais no programa Benoit™ 1.3 Fractal Analysis System.

4.2. Descritores de formas

No cálculo de índices de forma foi usado o programa Flatfile (Figura 10, Fluxograma), desenvolvido em nosso laboratório (LABTEC), e que segue um algoritmo que consiste em contar um pixel ao identificar a cor branca e não contar nenhum pixel ao encontrar a cor preta.

A determinação do comprimento das vênulas tributárias da veia central e da área contida no seu interior é obtido registrando-se os pixels nessas regiões e realizando-se sua normalização pela área total da imagem de fundo de olho. Os cálculos desses parâmetros foram obtidos como descritos na revisão de literatura (Item 2.4 Descritores de formas). O cuidado na normalização desses parâmetros se deve ao fato que as imagens de fundos de olhos têm diferentes tamanhos, sendo para os pacientes normais 936X936 e para os doentes 640X480 em unidades de pixels.

Outros índices de formas usados nesse trabalho são a circularidade e a retangularidade, calculados como mostrado na revisão de literatura. É interessante observar que a circularidade e a retangularidade são parâmetros adimensionais e, portanto, independem da área total da imagem digitalizada.

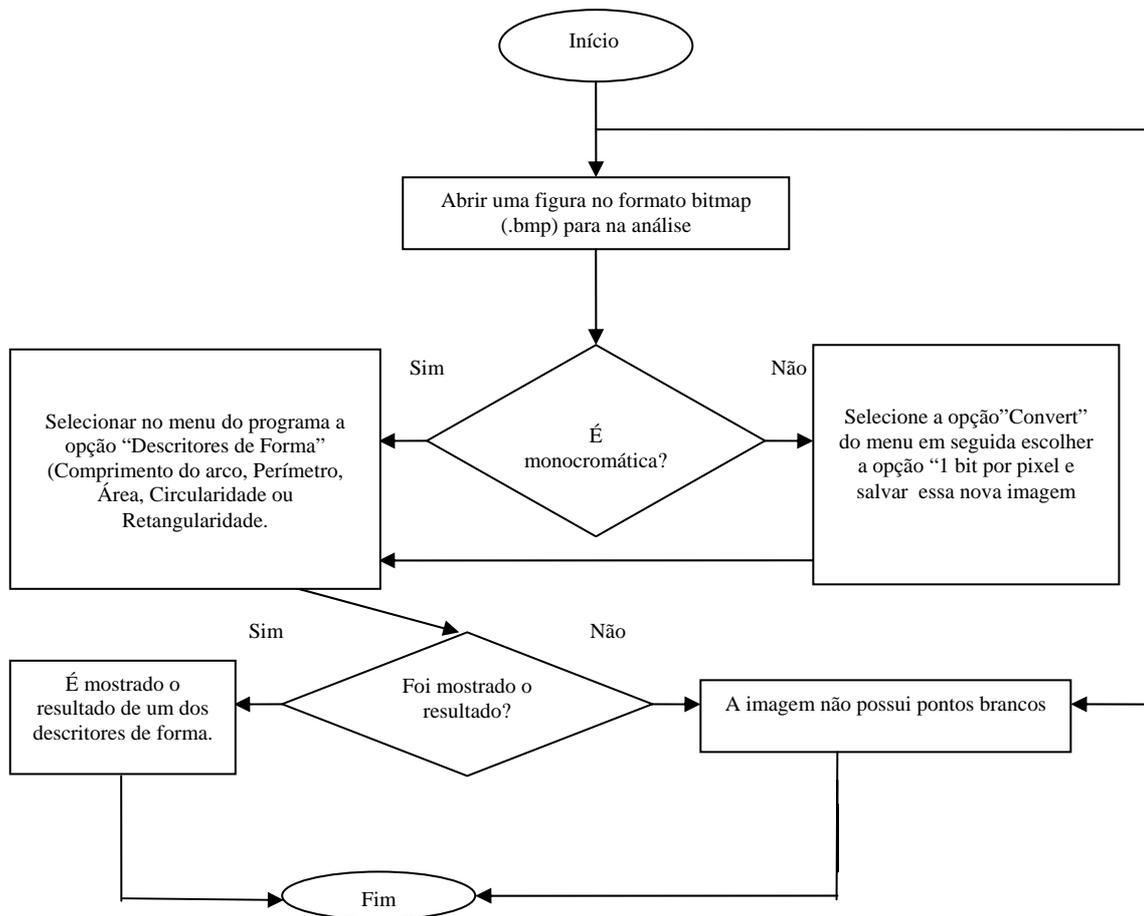


Figura 10. Fluxograma para se determinar um dos índices de forma de uma imagem das vênulas tributárias da veia central da retina humana.

4.3 Dimensão fractal

O método de contagem por caixas pode ser realizado manualmente ou por programas computacionais como o Benoit™ 1.3 Fractal Analysis System (Figura11) que utilizam imagens digitalizadas tipo arquivo bitmat em preto e branco.

Conforme já foi explicitado na revisão de literatura (item 2.3) e no item 4.1 deste capítulo o cálculo das dimensões fractais é realizado a partir da segmentação de toda vascularização da retina, fazendo-se uso do Software Benoit™ 1.3 Fractal Analysis System.

Nas figuras 12, 13 e 14 são mostrados os resultados dos cálculos realizados pelo programa Benoit™ 1.3 Fractal Analysis System para as dimensões de contagem por caixas, informação e massa-raio.

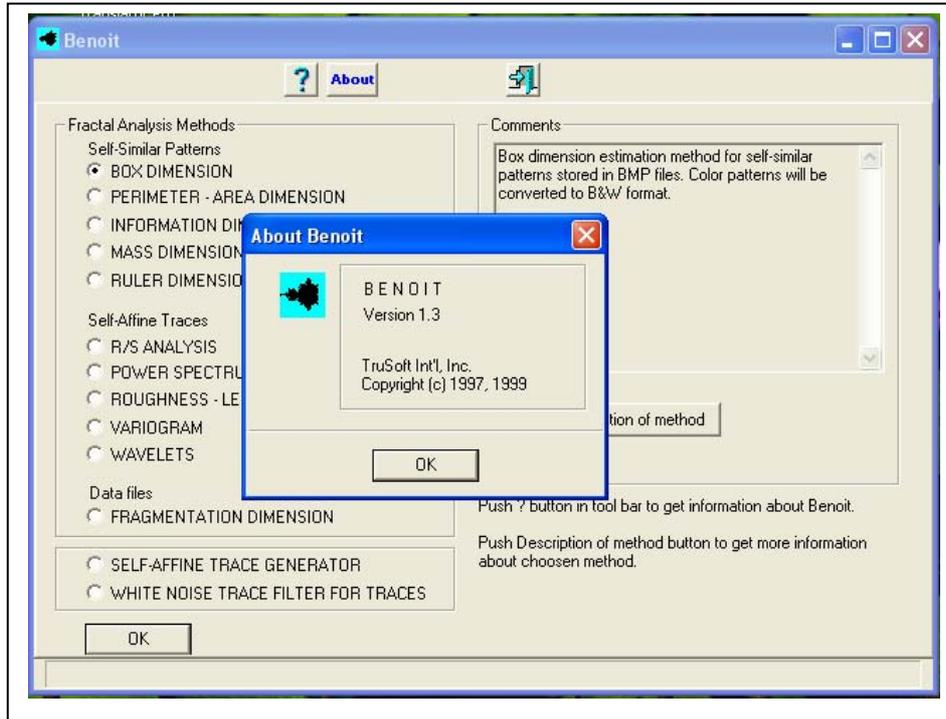


Figura 11. Janela do Software Benoit™ 1.3 Fractal Analysis System, onde foram realizados os cálculos das dimensões fractais.

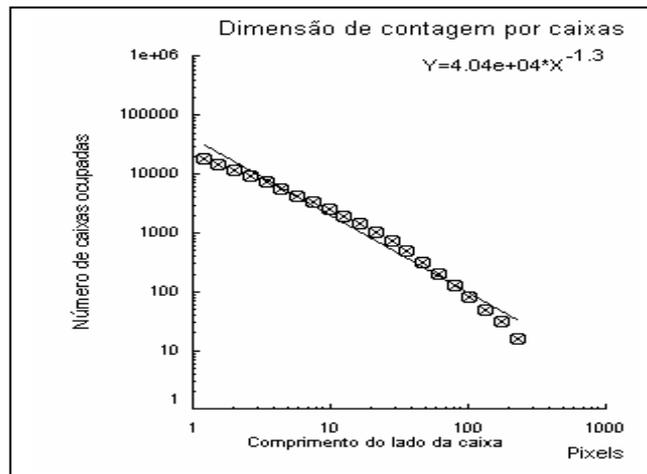


Figura 12. Imagem do gráfico, expondo o cálculo da dimensão de Contagem por caixas de toda vascularização da retina humana de indivíduo normal, onde foi usado o software Benoit™ 1.3 Fractal Analysis System.

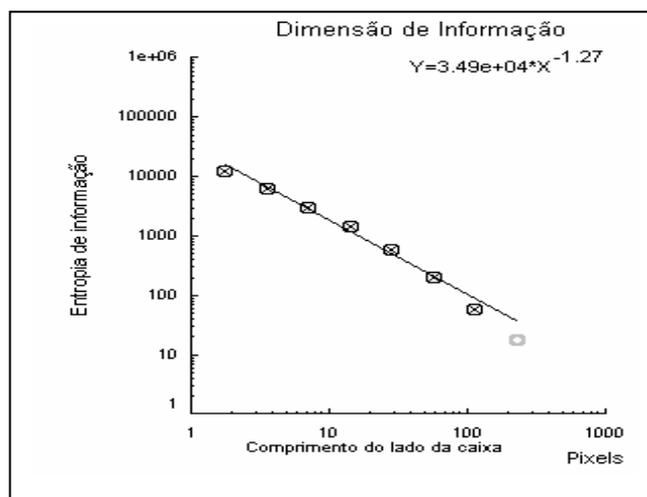


Figura 13. Gráfico do cálculo da dimensão de informação de toda vascularização da retina humana de um indivíduo normal, com o uso do software Benoit™ 1.3 Fractal Analysis System.

Um programa desenvolvido em nosso laboratório (LABTEC), em linguagem C (Anexo 7.1), permitiu o cálculo das coordenadas do centro de massa da região de maior densidade de pixels do objeto fractal (Figura 15, Fluxograma).

A determinação do centro de massa da região de maior densidade se fez necessário pois o Software Benoit™ 1.3 Fractal Analysis System executa o cálculo da dimensão de massa-raio a partir do centro da figura e isto induz erro na mensuração dessa dimensão.

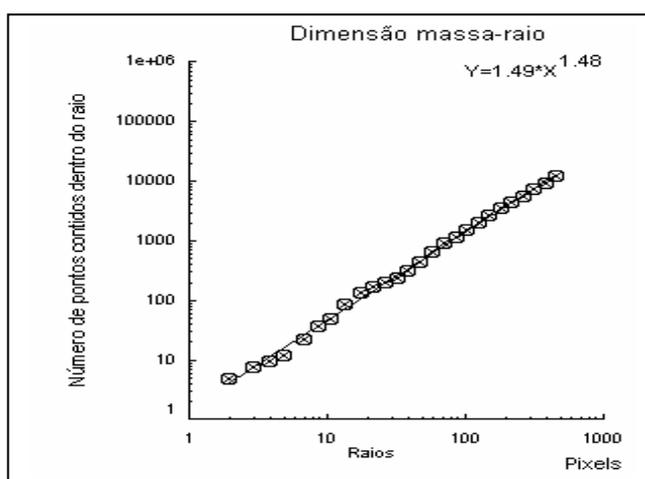


Figura 14. Imagem do gráfico da dimensão massa-raio para toda vascularização da retina humana de um paciente normal com centro de massa na região de maior densidade de pixel com o software Benoit™ Fractal Analysis System.

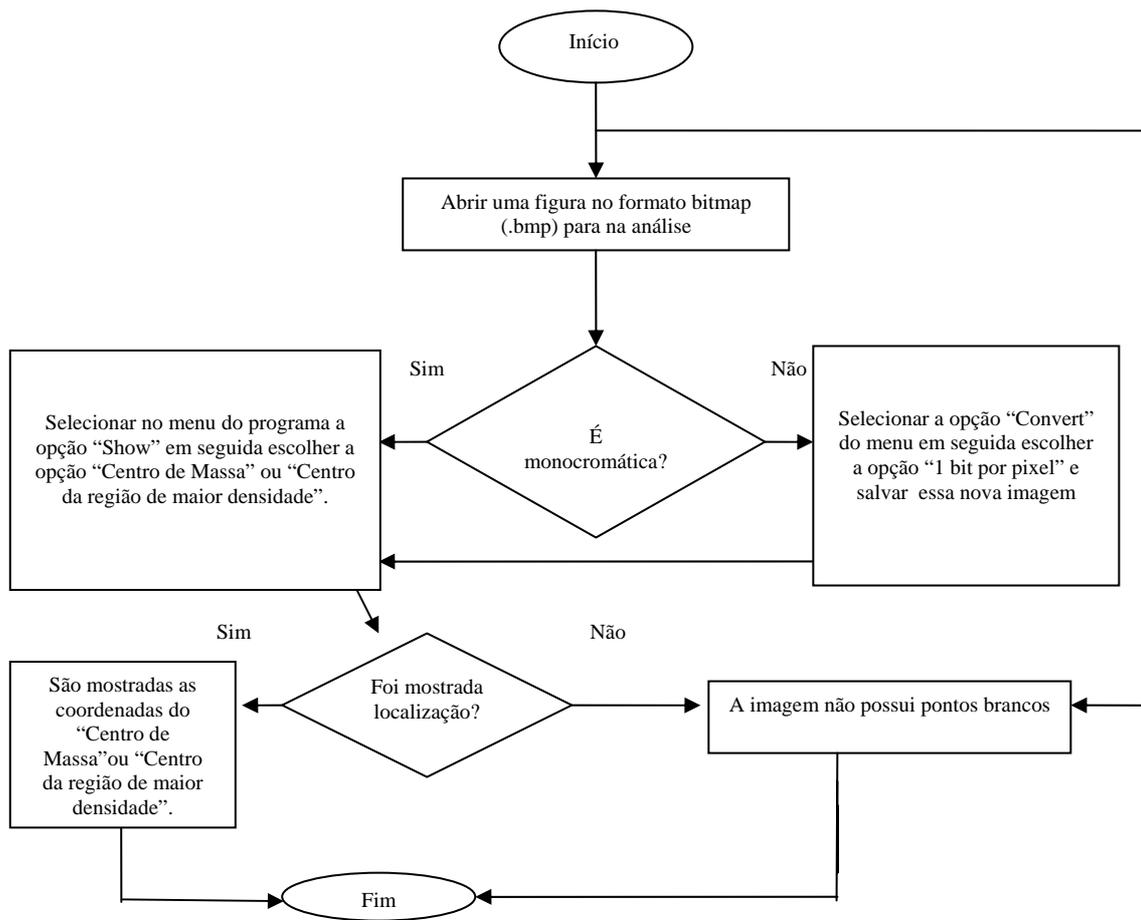


Figura 15. Fluxograma para determinação do centro de massa ou região de maior densidade das imagens segmentadas da vascularização da retina de humanos.

4.4. Estatística

Após o tratamento das imagens e o uso de programas Flatfile e Benoit™ 1.3 Fractal Analysis System para a realização dos cálculos de índices de forma e dimensão fractal é necessário o tratamento estatístico adequado dos dados. O software Statistica 5.0 foi usado para realizar os testes estatísticos. O teste de normalidade de Shapiro-Wilks foi usado para todos os parâmetros de interesse tais como comprimento do arco, área, retangularidade, circularidade, dimensão de box-counting, dimensão de informação e dimensão massa-raio (Figura 16). Testes paramétricos e não paramétricos, com nível de significância 5%, foram usados para comparar os diversos parâmetros no estado normal e patológico.

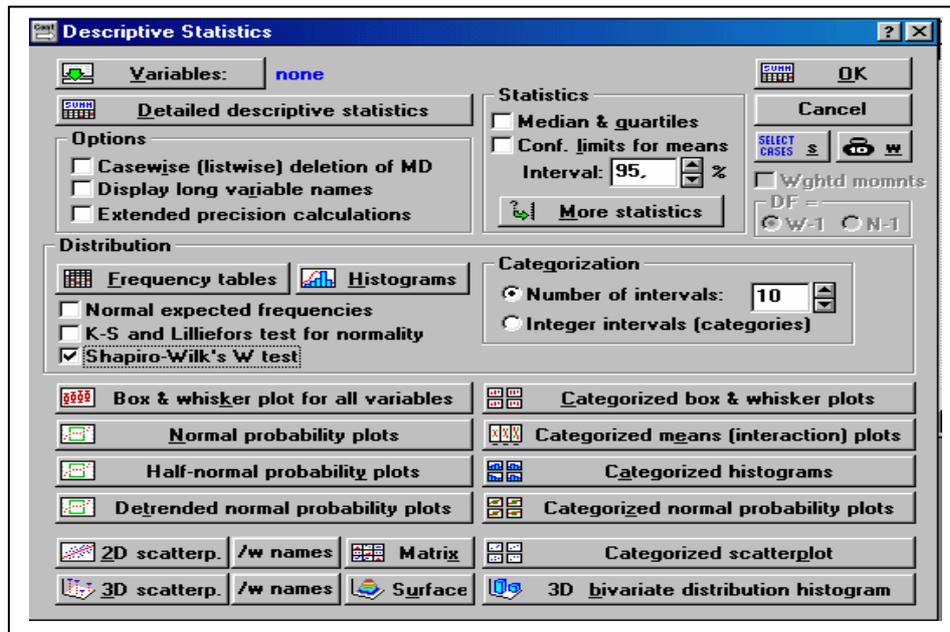


Figura 16. Janela do software Statistica 5.0, empregado para fazer o teste de normalidade tanto dos índices de forma como das dimensões fractais.

Distribuição Normal

A distribuição normal ($X \sim N(\mu, \sigma^2)$) é considerada como uma das mais importantes distribuições contínuas, pois no cotidiano a grande maioria dos fenômenos da natureza podem ser descritos por ela. Formalmente, esta distribuição pode ser descrita pela sua função de densidade, como segue:

$$f(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}}$$

Normalmente é preferível se trabalhar não com a função de densidade definida acima, mas com a forma estandardizada, onde podemos padronizar a variável x por uma variável Z que é denominada de distribuição normal padrão ou reduzida, onde as variáveis x e Z relacionam-se da seguinte maneira:

$$Z = \frac{x - \mu}{\sigma} \quad \text{ou} \quad X \sim N(0,1).$$

Teste de Shapiro-Wilks

O teste de Shapiro-Wilks é de grande importância no momento de decidir por uma estatística paramétrica ou não paramétrica. Este teste trabalha com os parâmetros da normal estimados a partir de dados de pequenas amostras, o que o torna bastante útil na área das ciências biológicas pois nem sempre temos disponíveis um grande número de dados (GUSTAVO, 2001).

Teste t

O teste t só é aplicado para dados contínuos e com distribuição Gaussiana. É, provavelmente, o mais usado para comparar a média de duas amostras. Este usa as diferenças entre as médias de dois grupos e o erro padrão das diferenças das médias entre dois grupos, é a seguinte a fórmula usada para seu cálculo:

$$t = \frac{\bar{x}_a - \bar{x}_b}{EP}$$

Onde EP (erro padrão) combina os desvios-padrão dos grupos e o número (n) em cada grupo e não é necessário dispor dos dados brutos para seu cálculo, podendo ser feito com base nas médias, desvios-padrão e tamanho de cada grupo. Para obter o valor de t é possível fazer cálculos manuais usando fórmulas a seguir ou um software estatístico

$$EP = \sqrt{S^2 \left(\frac{1}{n_a} + \frac{1}{n_b} \right)}$$

onde

$$S^2 = \frac{\left[\sum x_a^2 - (\sum x_a)^2 / n_a \right] + \left[\sum x_b^2 - (\sum x_b)^2 / n_b \right]}{(n_a - 1)(n_b - 1)}$$

O denominador desta fração exprime o que se convencionou chamar de graus de liberdade (G_{lib}) de cada amostra que nada mais é do que uma forma de fazer uma correção em função do tamanho da amostra (DÓRIA FILHO, 1999). Foi utilizado o software STATISTICA 5.0, para realização do teste t (Figura 20).

Neste trabalho o interesse é comparar os valores médios dos descritores de forma e dimensões fractais de retinas humanas normais e com retinopatia diabética não proliferativa.

Teste de Wilcoxon-Mann-Whitney

O teste de *Wilcoxon-Mann-Whitney*, *WMW*, ou simplesmente teste *U*, é um teste não-paramétrico aplicado em situações em que se tem um par de amostras independentes e se quer avaliar se as populações que deram origem a essas amostras podem ser consideradas semelhantes ou não. O teste *U* pode ser considerado a versão não-paramétrica do teste *t* de Student, para amostras independentes. A estatística *U* é base para decisão sobre aceitação ou não da hipótese de nulidade e é calculado da seguinte maneira:

- É formado um conjunto *W*, com os dados das duas amostras, *A* e *B*;
- O conjunto *W* é ordenado de forma crescente;
- Anota-se a ordem de cada elemento deste conjunto;
- Separam-se novamente as amostras *A* e *B*;
- O valor de *U* é a soma das ordens da amostra *A*.

Quanto mais baixo for o valor de *U* maior será a evidência de que as populações são diferentes. Isto se explica porque *U* é a soma de ordens, portanto, seu valor será baixo se na categoria *A* estiveram primeiro valores de ordem baixa (obviamente em *B* estarão os dados de ordem superior). É claro, então, que neste caso se evidencia uma diferença entre as populações.

A estatística *U* aproxima-se da distribuição normal à medida que o tamanho das amostras cresce, com média e variância dadas respectivamente por

$$\mu_w = \frac{n_A(n_A + n_B + 1)}{2}, \quad \sigma_w^2 = \frac{n_A \cdot n_B (n_A + n_B + 1)}{12}$$

de forma que a variável aleatória padronizada para *U*, com correção de continuidade, resulta em

$$z_w = \frac{|U - 0,5| - 0,5.n_A.(n_A + n_B + 1)}{\sqrt{\frac{n_A.n_B.(n_A + n_B + 1)}{12}}}$$

e a decisão de aceitar ou rejeitar H_0 estará, como de costume, associada ao nível de significância do teste p , resultante do valor de z_w . Para testes unilaterais, $p = \overline{w}(z_w)$. Para testes bilaterais, o resultado de p deve ser multiplicado por dois (GUSTAVO, 2001).

Neste trabalho o teste U será usado para comparar alguns índices de forma e dimensões fractais no estado normal e doente da retina. Foi utilizado o software STATISTICA 5.0 para realização do teste U.

ANOVA

Na análise estatística para comparar as três dimensões fractais da vascularização de retinas normais, fez-se necessário o uso da Análise de Variância (ANOVA) que indicará a probabilidade de que a hipótese nula seja verdadeira, ou seja, a probabilidade de que nenhuma diferença exista entre quaisquer dos grupos. Se a hipótese H_0 for rejeitada será o indício de que há diferença significativa entre alguns dos parâmetros testados. Neste caso, um teste pos-hoc de Tukey deve ser usado para identificar quais os parâmetros que diferem entre si. O programa Statistica 5.0 foi usado para realizar a ANOVA e o teste pos-hoc de Tukey.

5. RESULTADO

5.1. Descritores de forma:

Comprimento das imagens das vênulas tributárias da veia central no estado normal e com retinopatia diabética não proliferativa.

O comprimento das vênulas tributárias da veia central normalizada pela área total da imagem de fundo de olho foi um dos índices de forma usados nesse trabalho para parametrizar a vascularização da retina. O teste de Shapiro-Wilks mostrou que os comprimentos normalizados das vênulas tributárias da veia central das retinas das imagens de pacientes normais seguem uma distribuição gaussiana com média igual a 0,002231 e desvio padrão igual a 0,000166 ($W = 0,94337$ e $p < 0,1318$, $n = 30$) (Figura 17).

Nos pacientes com retinopatia diabética não proliferativa os comprimentos normalizados das vênulas tributárias da veia central da retina também obedeceram a uma curva gaussiana de média \pm desvio padrão igual a $0,003228 \pm 0,000434$ ($W = 0,93237$ e $p < 0,1128$, $n = 24$) (Figura 17).

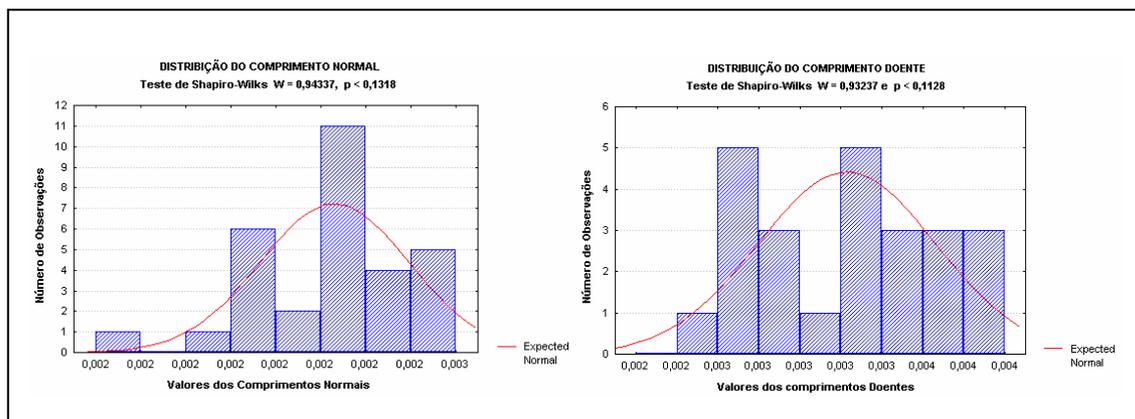


Figura 17. Janela do software Statistica 5.0, onde mostra-se o teste de normalidade para o comprimento das vênulas tributárias da veia central da retina em condições normal e doente.

Um teste t para amostras não pareadas mostra que as duas médias diferem significativamente entre si ($t = -11,5977$ e $p = 0,000$). A tabela 1 mostra a saída do programa Statistica 5.0.

Tabela 01. Teste t para comparação das médias do comprimento das vênulas tributárias da veia central da retina humana normal e com retinopatia diabética não proliferativa.

		Teste t para Comprimento N versus Comprimento D As Variáveis foram tratadas como independentes				
Grupo 1	vs. Grupo 2	Média Grupo 1	Média Grupo 2	Valor t	Valor df	Valor p
Comp_N	vs. Comp_D	.002231	.003228	-11,5977	52	.000000

Desta maneira, o comprimento normalizado das vênulas tributárias da veia central da imagem de fundo de olho pode ser um possível indicador da retinopatia diabética não proliferativa.

Áreas das imagens delimitadas pelos contornos das vênulas tributárias das veias centrais da retina no estado normal e com retinopatia diabética não proliferativa.

Um outro índice de forma utilizado nesse trabalho para parametrizar a vascularização da retina humana é a área da imagem delimitada pelas vênulas tributárias da veia central da retina normalizada pela área total da imagem de fundo de olho, no estado normal e com retinopatia diabética não proliferativa.

Testes de normalidade revelaram que as distribuições das áreas delimitadas pelos contornos das vênulas tributárias da veia central nos estados normal e com retinopatia diabética não proliferativa seguem curvas normais com médias \pm desvios iguais a: $0,411093 \pm 0,045333$ para a retina normal e $0,339231 \pm 0,055818$ para retina doente (Figura 18).

As probabilidades de as curvas seguirem distribuições normais foram 41,79% para o estado normal com uma amostra de tamanho igual a 30 e 44,12% para o estado doente com uma amostra de 24 valores. Um teste t, quando aplicadas as duas amostras, comprova que elas diferem significativamente entre si ($t = 4,741919$ e $p = 0,00017$). A tabela 2, abaixo, mostra a saída do software Statistica 5.0.

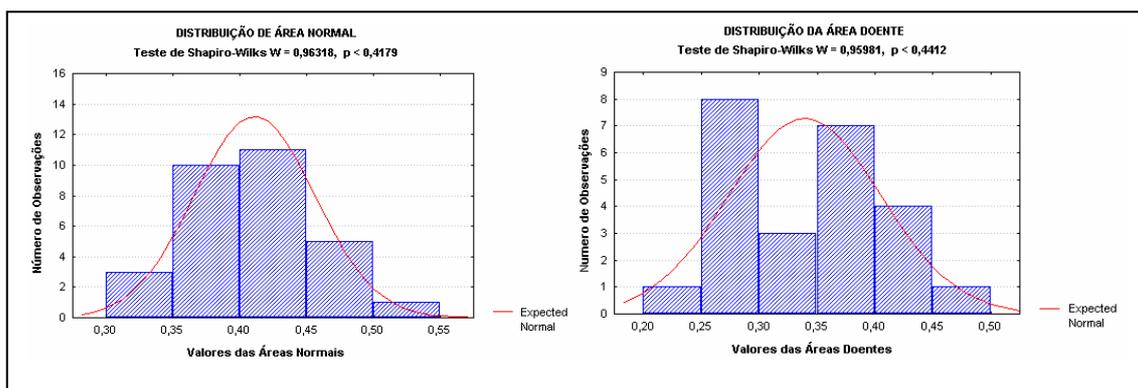


Figura 18. Janela do software Statística 5.0, onde vemos os gráficos do teste de normalidade para área delimitada pelas vênulas tributárias da veia central da retina humana em condições normal e patológica.

Tabela 02. Teste t para comparação de médias das áreas delimitadas pelas vênulas tributárias da veia central da retina humana normal e doente.

		Teste t para as variáveis Área N versus Área D As variáveis foram tratadas como independentes				
Grupo 1 vs. Grupo 2		Média Grupo 1	Média Grupo 2	Valor t	Valor df	Valor p
ÁREA N vs. ÁREA D		,411093	,339231	4,741919	52,0000	,000017

Desta forma, a área, poderá ser um parâmetro de diferenciação entre os estados normal e doente da retina.

Circularidade da área delimitada pelas vênulas tributárias da veia central da retina humana.

A circularidade da área delimitada pelas vênulas tributárias da veia central foi usada como um parâmetro para diferenciar os estados normal e doente da retina. Os parâmetros de circularidade para o estado normal seguiram uma distribuição normal de média igual a 23,71167 e desvio padrão de 2,070713 numa amostra de 30 valores.

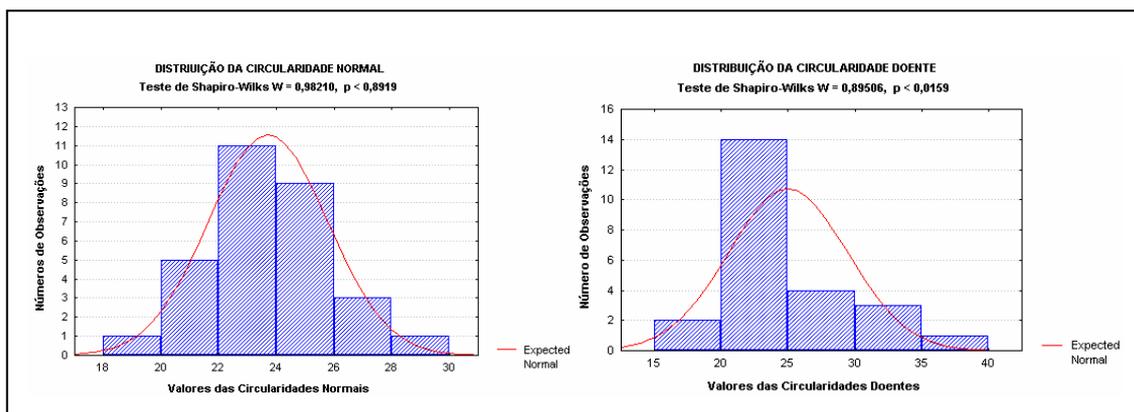


Figura 19. Janela do programa Statistica versão 5, mostrando os gráficos para distribuição da circularidade nos estados normal e doente da retina humana.

Nas imagens de fundo de olho de pacientes com retinopatia diabética os valores dos parâmetros de circularidade não seguiram uma curva normal ($W = 0,89506$ e $p < 0,0159$, $n = 24$) e apresentaram média igual a $24,98699$ e desvio padrão de $4,456967$ (Figura 19)..

O fato de a distribuição de probabilidade da circularidade da retina no estado doente não obedecer a uma distribuição gaussiana nos levou a aplicação de um teste não-paramétrico para comparar os valores médios das duas condições da retina. O teste U foi usado na comparação desses valores médios. A janela do programa Statistica 5.0 (Tabela 3) mostra o procedimento usado para realização desse teste com a planilha. A análise dos resultados fornecidos pelo programa revela que as médias das circularidades da veia central nos estados normal e doente não diferem significativamente entre si ($U = 337,0000$ e $p = 0,688880$). Portanto, este não é um bom parâmetro para discriminar diferentes condições do processo vascular.

Tabela 03. Teste U para comparação das médias da circularidade normal e doente descrita pelas vênulas tributárias da veia central da retina humana.

Teste U com as variáveis Cir Normal versus Cir Doente							
Grupo 1: 100-Cir N Grupo 2: 101-Cir D							
Variável	GrauSoma Cir S	GrauSoma Cir D	Valor U	Valor Z	Nível p	Z Ajustado	Nível p
VAR_DEP	802,0000	683,0000	337,0000	-,400379	,688880	-,400379	,688880

Retangularidade da área delimitada pelas vênulas tributárias da veia central da retina humana.

A retangularidade da área delimitada pelas vênulas tributárias da veia central também foi usada como parâmetro de diferenciação entre a retina normal e doente. Na retina normal o parâmetro retangularidade não apresentou uma curva com distribuição normal ($W = 0,86406$ e $p < 0,0010$, $n = 30$) com valores de média \pm desvio padrão de $0,703298 \pm 0,092780$ para uma amostra de 30 unidades (Figura 20).

Nas imagens dos pacientes com retinopatia diabética não proliferativa, depois de efetuado teste de normalidade, constatou-se que o parâmetro retangularidade seguiu uma curva gaussiana ($W = 0,92972$ e $p < 0,0981$, $n = 24$). O valor da média \pm desvio padrão foi igual a $0,683156 \pm 0,116713$ com 24 unidades amostrais.

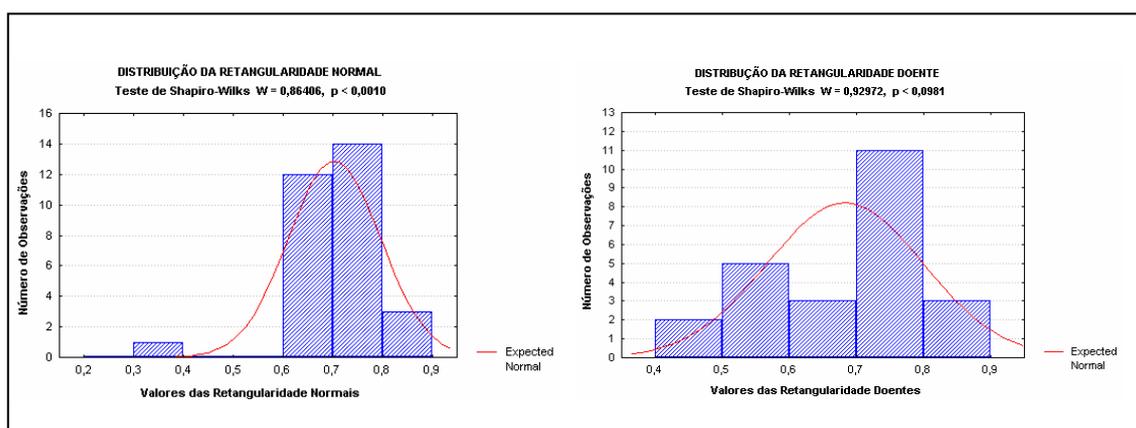


Figura 20. Janela do programa Statistica versão 5.0, onde mostram-se os gráficos para normalidade da retangularidade normal e doente.

O teste U foi usado também nesse caso e a análise dos resultados fornecidos pelo programa, conforme tabela 4, revela que as médias das retangularidades das vênulas tributárias da veia central da retina nos estados normal e doente não diferem significativamente entre si ($U = 338,0000$ e $p = 0,701744$). Portanto, a retangularidade não serve como parâmetro de diferenciação entre os estados normal e doente das vênulas tributárias da veia central da retina.

Tabela 04. Teste U para comparação das médias da retangularidade normal e doente descritas pelas vênulas tributárias da veia central da retina humana.

Variável	Teste U com as variáveis Ret Normal versus Ret Doente Grupo 1: 100-Ret N Grupo 2: 101-Ret D					
	GrauSoma Ret S	GrauSoma Ret D	Valor U	Valor Z	Nivel p	Z Ajustado
VAR_DEP	847,0000	638,0000	338,0000	,382971	,701744	,382971

5.2. Dimensões fractais

Dimensões fractais da vascularização da retina no estado normal e com retinopatia diabética não proliferativa.

As três dimensões fractais das retinas normais apresentaram distribuições gaussianas ($W = 0,95530$ e $p < 0,2700$, $n = 30$), ($W = 0,95589$ e $p < 0,2793$, $n = 30$) e ($W = 0,96271$ e $p < 0,4076$, $n = 30$) para dimensão fractal calculadas pelos métodos de box-counting, informação e massa-raio, respectivamente e médias \pm desvios padrão, respectivamente, iguais a: $(1,268187 \pm 0,021842)$; $(1,313993 \pm 0,020032)$ e $(1,482485 \pm 0,084166)$ (Figura 21).

Com relação às retinas de indivíduos com retinopatia diabética não proliferativa a dimensão fractal de box-counting não apresentou uma distribuição normal ($W = 0,89656$ e $p < 0,0172$, $n = 24$), já as outras duas dimensões apresentaram distribuições normais ($W = 0,92384$ e $p < 0,0720$, $n = 24$, para dimensão de informação) e ($W = 0,95832$ e $p < 0,4127$, $n = 24$, para dimensão de massa-raio) (Figura 22).

As médias \pm desvios padrões, apresentadas pelas retinas com retinopatia diabética, para dimensão fractal calculadas por box-counting, informação e massa-raio foram, respectivamente, $(1,252559 \pm 0,040432)$, $(1,350569 \pm 0,040550)$ e $(1,540265 \pm 0,108159)$.

As dimensões fractais dos processos de vascularização dos indivíduos normais e com retinopatia diabética não proliferativa diferiram significativamente, independentemente do método usado no cálculo da dimensão fractal. Os resultados encontrados nos teste U e t foram os seguintes: ($U = 276,0000$, $p = 0,143674$) para dimensão de box-counting, ($t = -4,33059$, $p = 0,000068$) para dimensão de informação e ($t = -2,20868$, $p = 0,031628$) para dimensão massa-raio (Tabela 5, 6 e 7).

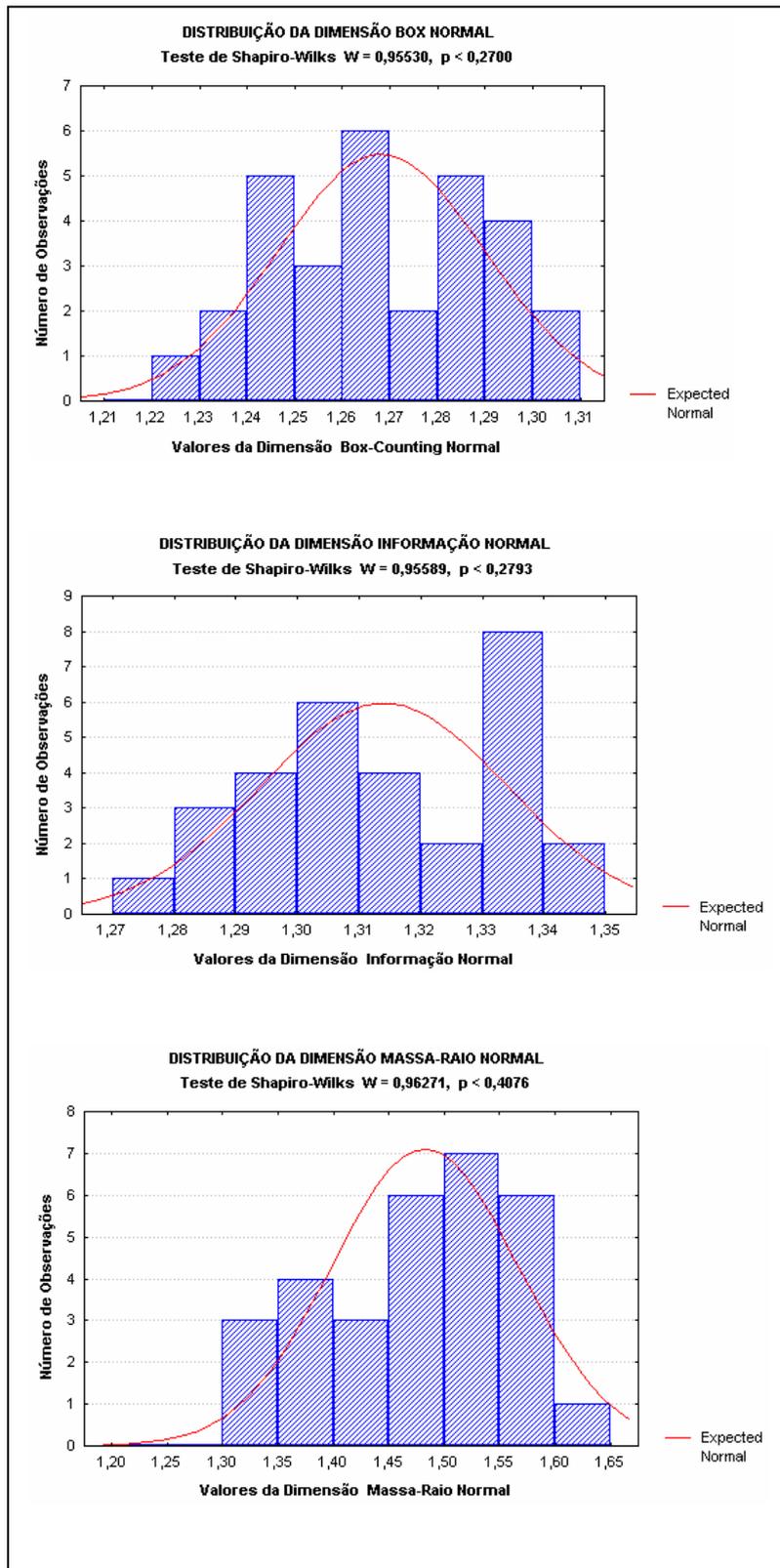


Figura 21. Janela do programa Statistica 5.0, onde mostram-se os gráficos de normalidade para dimensão de box-counting, informação e massa-raio da vascularização da retina de indivíduos normais.

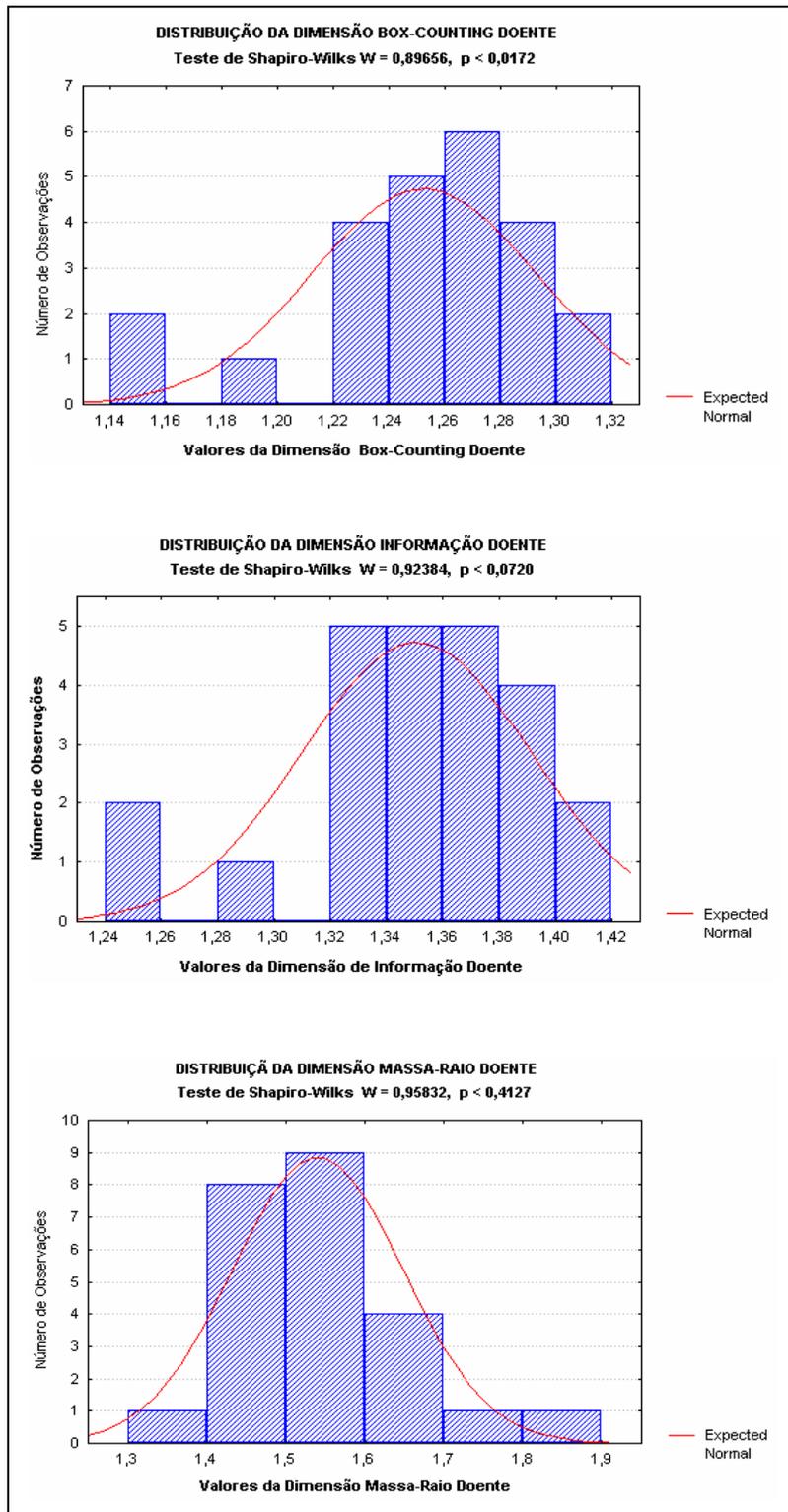


Figura 22. Janela do programa Statistica 5.0, onde são mostrados os gráficos de normalidade para dimensão de box-counting, informação e massa-raio para vascularização da retina de pacientes com retinopatia diabética não proliferativa.

Tabela 05. Janela do programa Statistica 5.0, onde é mostrado o resultado do teste U, para comparação de médias da dimensão de box-counting dos vasos retinianos no estado normal e com retinopatia diabética não proliferativa.

Teste U com as variáveis Box Normal versus Box Doente							
Grupo 1: 100-Box N Grupo 2: 105-Box D							
Variável	GrauSoma Box N	GrauSoma Box D	Valor U	Valor Z	Nível p	Z Ajustado	Nível p
VAR_DEP	576,0000	909,0000	276,0000	-1,46225	,143682	-1,46228	,143674

Tabela 06. Teste t realizado no programa Statistica 5.0, onde mostra-se a comparação das médias da dimensão de informação dos vasos retinianos nos estados normal e com retinopatia diabética não proliferativa.

Teste t para Informação N versus Informação D					
As Variáveis foram tratadas como independentes					
Grupo 1 vs. Grupo 2	Média Grupo 1	Média Grupo 2	Valor t	Valor df	Valor p
INF_N vs. INF_D	1,313993	1,350569	-4,33059	52,00000	,000068

Tabela 07. Teste t feito no programa Statistica 5.0, onde se visualizou o resultado da comparação das médias da dimensão massa-raio dos vasos retinianos nos estados normal e com retinopatia diabética não proliferativa.

Teste t para Massa-raio N versus Massa-raio D					
As Variáveis foram tratadas como independentes					
Grupo 1 vs. Grupo 2	Média Grupo 1	Média Grupo 2	Valor t	Valor df	Valor p
MAS_N vs. MAS_D	1,482485	1,540265	-2,20868	52,0000	,031628

Uma ANOVA foi usada para comparar os três métodos de dimensões fractais aplicados nos cálculos das retinas normais (Tabela 8). Para retinas de indivíduos com retinopatia diabética não foi possível usar uma ANOVA devido a não normalidade da dimensão de box-counting, e neste caso foram usados os testes U ou t.

Tabela 08. ANOVA realizada com uso software Statistica 5.0 para as dimensões de box-counting, informação e massa-raio da vascularização de indivíduos normais.

1-ANOVA Box N, Informação N e Massa-raio N						
Efeito	df Efeito	MS Efeito	df Erro	MS Erro	Valor F	Nível p
1	2	,382056	87	,002654	143,9503	,000000

Os resultados obtidos mostram que na retina de indivíduos normais as três dimensões diferiram significativamente entre si ($F = 143,9503$ $p = 0,00000$). Este resultado mostra que dependendo do tipo de dimensão fractal utilizado para descrever o processo de vascularização da retina, diferentes valores pode ser obtidos para este parâmetro. Isto sugere que o processo de vascularização da retina humana é um multifractal.

Nos pacientes com retinopatias diabéticas não proliferativa somente a dimensão de box-counting não segue uma distribuição normal, neste caso tivemos que realizar a comparação das médias usando-se os testes t e U . Realizamos o teste U para comparar as dimensões de contagem por caixas e informação e contagem por caixas e massa-raio das retinas com retinopatia diabética não proliferativa (tabela 09 e 10). Na comparação das dimensões de informação e massa-raio foi usado um teste t (Tabela 11)

Como podem ser observadas nas tabelas 9, 10 e 11 as dimensões de box-counting, informação e massa-raio da vascularização da retina de indivíduos com retinopatia diabética não proliferativa também diferiram significativamente.

Tabela 09. Teste U , realizado para comparar as médias da dimensão fractal da vascularização da retina pelos métodos de contagem por caixas e informação em indivíduos com retinopatia diabética não proliferativa.

Teste U, com as variáveis Box doente versus Informação doente							
Grupo 1: 100-Box D Grupo 2: 101-Inf D							
Variável	GrauSoma Box D	GrauSoma Inf D	Valor U	Valor Z	Nível p	Z Ajustado	Nível p
VAR DEP	331,0000	845,0000	31,00000	-5,29925	,000000	-5,29925	,000000

Tabela 10. Teste U, realizado para comparar as médias da vascularização da retina da dimensão de box-counting e massa-raio em indivíduos com retinopatia diabética não proliferativa.

		Teste U, com as variáveis Box doente versus Massa-raio doente Grupo 1: 100-Box D Grupo 2: 101-Mas D					
Variável	GrauSoma Box D	GrauSoma Mas D	Valor U	Valor Z	Nivel p	Z Ajustado	Nivel p
VAR_DEP	300,0000	876,0000	0,00	-5,93846	,000000	-5,93846	,000000

Tabela 11. Teste t realizado para comparar as médias da vascularização da retina da dimensão de informação e massa-raio em indivíduos com retinopatia diabética não proliferativa.

		Teste t, para Informação D versus Massa-raio D As Variáveis foram tratadas como independentes				
Grupo 1 vs. Grupo 2	Média Grupo 1	Média Grupo 2	Valor t	Valor df	Valor p	
INF_D vs. MAS_D	1,350569	1,540265	-8,04530	46,0000	,000000	

6. DISCUSSÃO

Uma importante característica das formas em biologia é a sua complexidade. No entanto, como lidar com formas complexas, como a vascularização da retina humana, não é uma tarefa fácil. Foi proposto neste trabalho relacioná-las às propriedades geométricas do espaço que as contêm. Nesse sentido foram sugeridos alguns índices de formas para parametrizar o processo complexo da vascularização da retina humana. Os índices de forma usados aqui foram comprimento, área, circularidade e retangularidade das vênulas tributárias da veia central da retina. Estes índices apesar de não trazerem informações sobre todo padrão complexo da vascularização da retina, podem fornecer parâmetros simples que permitam descrever o crescimento dos vasos nos estados normais e doentes.

Os índices de formas, comprimento de arco e área usados para descrever a geometria das vênulas tributárias da veia central da retina humana, diferiram significativamente nas retinas normal e com retinopatia diabética não-proliferativa. Desta forma, esses índices podem ser usados para diferenciar a retina normal daquela com retinopatia diabética não proliferativa.

Os índices de formas, circularidade e retangularidade usados para descrever a geometria das vênulas tributárias da veia central da retina humana, não apresentaram diferenças significativas entre as retinas normal e com retinopatia diabética não-proliferativa. Desta forma, esses índices não são convenientes para serem usados na diferenciação entre a retina normal daquela com patologia.

Uma outra abordagem para análise de formas complexas, como a vascularização da retina humana, é o uso da geometria fractal, que tem sido proposta na busca de identificar padrões nessas estruturas irregulares construídas pela natureza.

Diferentes métodos para o cálculo da dimensão fractal da vascularização da retina de humanos têm sido sugeridos na literatura especializada como os métodos de box-counting, massa-raio e correlação (FAMILY *et al.*, 1989; MASTERS, 1994; MISSON *et al.*, 1992 ; LANDINI *et al.*, 1993; MASTERS, 2004). Neste trabalho, foram usados os métodos de box-counting, de massa-

raio e de informação visando definir qual o método mais adequado para o cálculo da dimensão fractal da vascularização da retina humana.

Os resultados obtidos, neste trabalho, mostram que dependendo do tipo de dimensão fractal utilizado para descrever o processo de vascularização da retina, diferentes valores podem ser obtidos para este parâmetro. Isto nos leva a sugerir que o processo de vascularização da retina humana é um multifractal.

É interessante observar no presente estudo que, entre os métodos avaliados para calcular a dimensão fractal da vascularização da retina humana de indivíduos normais, o método de massa-raio forneceu um valor mais próximo ao da dimensão fractal do DLA ≈ 1.7 (FAMILY *et al.*, 1989). É interessante esclarecer que num DLA muito denso é esperado que os cálculos das dimensões fractais pelos três métodos devam convergir para um mesmo valor. No entanto, a vascularização da retina não é um processo suficientemente denso para que os três métodos possam ser aplicados indiferentemente. Anteriormente, Family *et al.* (1989) utilizaram os métodos de massa-raio ($D = 1,71 \pm 0,07$) e correlação ($D = 1,72 \pm 0,03$), porém não observaram qualquer diferença significativa entre os resultados obtidos pelos dois métodos. Mainster *et al.* (1990), usando a dimensão de box-counting, mostraram que os padrões arteriais e venosos da retina humana tem dimensões fractais de $1,63 \pm 0,05$ e $1,71 \pm 0,07$, respectivamente, consistente com a dimensão do DLA. Esta informação reforça a hipótese de que fatores que controlam a angiogênese retiniana devem obedecer a um processo de difusão limitada por agregação, como sugerido por Family *et al.* (1989) e Masters *et al.* (1989). Araújo *et al.* (2003) calcularam a dimensão fractal do DLA pelo método de box-counting (1.464 ± 0.011) e raio de giração (1.722 ± 0.057). Como o método raio de giração apresentou um valor próximo aquele obtido para um DLA, este método foi utilizado para calcular a dimensão fractal da vascularização da retina de cães normais e sua dimensão foi 1.752 ± 0.119 (ARAÚJO, 2004). É interessante observar que, mesmo a retina do cão tendo características vasculares diferentes da retina humana, a dimensão fractal das duas estruturas são semelhantes, sugerindo que o processo difusional dos fatores de crescimento vascular na retina das duas espécies devem ocorrer de maneira semelhante.

As dimensões fractais dos processos de vascularização dos indivíduos normais e com retinopatia diabética não proliferativa diferiram

significativamente, independentemente do método usado no cálculo da dimensão fractal. Esses resultados são consistentes com aqueles obtidos por Family *et al.* (1989), mostrando que as dimensões fractais do processo de vascularização da retina de indivíduos normais e com retinopatia diabética são diferentes entre si.

Finalmente, deve ser observado que neste trabalho foi dada uma importante contribuição para o uso adequado do programa Benoit™ 1.3 Fractal Analysis System, no que diz respeito ao cálculo da dimensão de massa-raio. Isto foi realizado através da elaboração de um programa em linguagem C que permite a determinação das coordenadas do centro de massa da região de maior densidade de pixels da estrutura fractal e que deve ser usada como referência para o cálculo dessa dimensão (ver métodos). Quando este procedimento não foi empregado o programa Benoit forneceu valores totalmente inadequados para a dimensão de massa-raio.

7. CONCLUSÕES

- 7.1 A segmentação manual dos vasos da retina permitiu a obtenção de imagens bem definidas do processo vascular que possibilitaram a sua parametrização através de índices de formas e dimensão fractal;
- 7.2 Os índices de formas, comprimento de arco e área usados para descrever a geometria das vênulas tributárias da veia central da retina humana diferiram significativamente nas retinas normal e com retinopatia diabética não-proliferativa. Desta forma, esses índices podem ser usados para diferenciar a retina normal daquela com enfermidade;
- 7.3 Os índices de formas, circularidade e retangularidade usados para descrever a geometria das vênulas tributárias da veia central da retina humana não apresentaram diferenças significativas entre as retinas normal e com retinopatia diabética não-proliferativa. Desta forma, esses índices não são convenientes para serem usados na diferenciação da retina normal daquela com patologia;
- 7.4 A dimensão fractal do processo de vascularização da retina humana nos estados normal e com retinopatia diabética não-proliferativa diferiram significativamente entre si independentemente do método usado no cálculo dessa dimensão. Portanto, a dimensão fractal é um parâmetro que pode ser usado para diferenciar indivíduos normais daqueles com retinopatia diabética não proliferativa;
- 7.5 Dependendo do tipo de dimensão fractal utilizado para descrever o processo de vascularização da retina, pode-se obter diferentes valores para este parâmetro. Isto nós leva a sugerir que o processo de vascularização da retina humana é um multifractal.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARAÚJO et al. Análise Fractal da vascularização da retina do cão. In: **IV Simpósio de Pesquisa e Pós-Graduação da UFRPE**, Recife, Imprensa Universitária, 2003.
2. ARAÚJO, L. S. **Análise fractal da vascularização da retina de cães com visão normal**. 2004. 35 p. Tese (Mestrado em Biometria) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
3. AVAKIAN, A. et al. Fractal analysis of region-based change in the normal and non-proliferative diabetic retina. **Current Eye Research**, England , v. 24, p. 274-280, 2002.
4. BASSINTHWAIGHT, J. B.; LIEBOVITCH, L. S.; WEST, J. B.; **Fractal Physiology**. New York: Oxford University Press, 1994.
5. COSTA, L. F. e CEZAR, Jr. R. M., 2001. **Shape analysis and classification: theory and practice**. CRC Press. New York. 659 p.
6. DÓRIA FILHO U. **Introdução à Bioestatística: para simples mortais**. São Paulo: Negócio, 1999.
7. DUARTE NETO, P. J. **Análise Multivariada da Forma do Otólito Sagita para Discriminação de Estoques de Dourado, *coryphaena hippurus* (pisces: coryphaenidae), no nordeste do Brasil**. 2005. 42p. Tese (Mestrado em Biometria) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
8. FAMILY, F.; MASTERS, R.B.; PLATT, D. E. Fractal Pattern Formation in Human Retinal Vessels. **Physical D**, Netherlands, v.38, 1989. 98-103 p.
9. GOMES, M; NOGUEIRA, R. A.; COUTINHO, S. **Fractais nas ciências biológicas, exatas e tecnologia**. Recife: SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 1993. 70p.

10. GUSTAVO, H. A. **Bioestatística teórica e computacional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
11. KRETZER, F. L. et al. Vitamin E protects against retinopathy of prematurity through action on spindle cells, **Nature**, England, v. 309, n. 5971, 1984, p. 793-795.
12. KRETZER, F. L.; HITTNER, H. M. Retinopathy of prematurity: clinical implications of retinal development, **Archives of Disease in Childhood**., England, v. 63, 1988, p. 1151- 1167.
13. LANDINI G. *et al.* Fractal analysis of the normal human retinal fluorescein angiogram. **Current Eye Research**, England ,v. 12, p. 23-27, 1993.
14. MANDELBROT, B. **The fractal geometry of nature**. Nova York: W.H. Freeman, 1983. 468 p.
15. MAINSTER, M.A. The fractal properties of retinal vessels: Embryological and clinical implications, **Eye**, London, v. 4, 1990, p. 235-241.
16. MASTERS, B.R., *et al.* Development of human retinal vessels: a fractal analysis. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 30, 1989, p. 391 (Suppl.).
17. MASTERS, B. R. Fractal analysis of normal human retinal blood vessels, **Fractals**, Singapore, v. 2, 1994, p. 103-110.
18. MASTERS, B. R. Fractal analysis of the vascular tree in the human retina, **Annual Review of Biomedical Engineering**, United States, v.6, 2004, p. 427 – 452.
19. MISSON, G. P.; LANDINI, G.; MURRAY, P. I. Fractals and ophthalmology, **Lancet**, England, v. 339, 1992, p. 872.

20. MEAKIN, P. A. New Model for biological pattern formation. **Journal of Theoretical Biology**, v.118, 1986, p.101-113.
21. MONTEIRO, L.R. e S.F. REIS, **Princípios de Morfometria Geométrica**. Ribeirão Preto: Holo, 1999. 1-2p
22. NOER, A. **O fundo do olho: método de exames e achados típicos**. 5. ed. São Paulo: Manole, 1992. 33 -137p.
23. NUSSENZVEIG, H.M., 1990. **Complexidade e caos**. UFRJ/CPEA.
24. ROHLF, F.J. e BOOKSTEIN, F.L., 1990. **Proceedings of the Michigan Morphometrics Workshop**. University of Michigan. Museum of Zoology Special Publicatoin 2.
25. SANDER, L. M. Fractal growth, **Nature**, England, Vol. 322, 1986, p. 789-93.
26. STADES, F.C. et al. **Fundamentos da Oftalmologia Veterinária**. São Paulo: Manole, 1999. p. 45-68.
27. VAUGHAN, D. G.; ASBURY, T.; RIORDAM-EVA, P. **Oftalmologia geral**. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1997. 186 -207 p.
28. VICSEK, T., **Fractal Growth Phenomen**, World Scientific, Singapore, 1991. p. 81-82.
29. WITTEN, t. A.; CATES, M. E. Tenuous structures from disorderly growth processes, **Science**, United States, v. 232, 1986, p.1607-1612.

9. ANEXOS

9.1 Programa em C Flatfile

```
/*-----  
Formas.C -- (c)  
-----*/  
  
#include <windows.h>  
#include <stdio.h>  
#include <conio.h>  
#include "dibhelp.h"  
#include "dibpal.h"  
#include "dibconv.h"  
#include "resource.h"  
#include <stdlib.h>  
#include <math.h>  
  
typedef struct  
{  
    int    somax ;  
    int    somay ;  
    int    qtdePontos;  
    int    multXY;  
}  
Cmassa, * PCmassa ;  
  
/*-----  
Função que calcula o centro de massa do bitmap  
-----*/  
Cmassa CalCentro2 (HDIB hdib){  
  
    Cmassa centro;  
    RGBQUAD prgb;  
  
    int x,y,somax,somay,multxy,cont,xmax, ymax;  
  
    x = y = somax = somay = multxy = cont = xmax = ymax = 0;  
  
    ymax = (int) DibHeight (hdib);  
    xmax = (int) DibWidth (hdib);  
  
    for(x; x < xmax; x++){  
        y = 0;  
        for(y; y < ymax; y++){  
            if(DibGetPixelColor (hdib, x, y, &prgb))  
                if(prgb.rgbBlue == 255 && prgb.rgbGreen == 255 &&  
prgb.rgbRed == 255){  
                    somax = x + somax;
```

```

        somay = y + somay;
        multxy = x * y;
        cont = cont + 1;
    }
}

if(cont == 0){
    centro.somax = -1;
    centro.somay = -1;
    centro.multXY = 0;
    centro.qtdePontos = 0;
}
else{
    centro.somax = somax;
    centro.somay = somay;
    centro.multXY = multxy;
    centro.qtdePontos = cont;
}
return centro;
}

/*-----
Função que calcula o centro de massa do bitmap
-----*/

int CalculaArea (HDIB hdib){
    RGBQUAD prgb;

    int xmax = 0, ymax = 0, area = 0;
    int x,y;
    x = y = 0;

    ymax = (int) DibHeight (hdib);
    xmax = (int) DibWidth (hdib);

    for(x; x < xmax; x++){
        y = 0;
        for(y; y < ymax; y++){
            if(DibGetPixelColor (hdib, x, y, &prgb))
                if(prgb.rgbBlue == 255 && prgb.rgbGreen == 255 &&
prgb.rgbRed == 255){
                    area = area + 1;
                }
            }
        }
    }
    return area;
}
}

```

```

int MostraArea ( HDC hdc,int area)
{
    static TCHAR  szCurva[] = TEXT ("A area da imagem é: %d pixels "),
        szNada[] = TEXT ("Essa imagem não é mono-cromática ou não tem
pontos brancos "),
        buffer[70],buf[50];

    if(area == 0){
        TextOut (hdc, 10, 20, buffer, wsprintf(buffer,szNada)) ;

    }else{

        TextOut (hdc, 10, 20, buf, wsprintf(buf,szCurva,area)) ;
    }
    return 1;
}

/*-----
Função que calcula o largura maxima
-----*/

int CalculaLarguraMax (HDIB hdib,HDC hdc,int cx,int cy,int cxBitmap,
int cyBitmap){
    RGBQUAD  prgb;

    int xmax = 0, ymax = 0,largura = 0;
    int x,y,contador,base;
    x = y = contador = base = 0;

    ymax = (int) DibHeight (hdib);
    xmax = (int) DibWidth (hdib);

    for(x; x < xmax; x++){
        y = 0 ;
        for(y; y < ymax; y++){
            if(DibGetPixelColor (hdib, x, y, &prgb)
            if(prgb.rgbBlue == 255 && prgb.rgbGreen == 255 &&
prgb.rgbRed == 255){
                if(base == 0)
                    contador = base = x;
                else
                    contador = x;
            }
        }
    }

    largura = contador - base + 1;
}

```

```

//desenha os limites do largura
SelectObject (hdc,CreatePen (PS_SOLID, 1, RGB (255, 0, 0))) ;

MoveToEx (hdc, base - 1 + ((cx - cxBitmap) / 2), ((cy - cyBitmap) / 2),NULL) ;
LineTo (hdc, base +((cx - cxBitmap) / 2), ymax + ((cy - cyBitmap) / 2)) ;

MoveToEx (hdc, contador + ((cx - cxBitmap) / 2), ((cy - cyBitmap) / 2),NULL)
;
LineTo (hdc, contador +((cx - cxBitmap) / 2), ymax + ((cy - cyBitmap) / 2)) ;

return largura;
}

/*-----
Função que calcula o comprimento maximo
-----*/

int CalculaComprimentoMax (HDIB hdib,HDC hdc,int cx,int cy,int cxBitmap,
int cyBitmap){
RGBQUAD prgb;

int xmax = 0, ymax = 0,comprimento = 0;
int x,y,contador,base;
x = y = contador = base = 0;

ymax = (int) DibHeight (hdib);
xmax = (int) DibWidth (hdib);

for(y; y < ymax; y++){
x = 0 ;
for(x; x < xmax; x++){
if(DibGetPixelColor (hdib, x, y, &prgb))
if(prgb.rgbBlue == 255 && prgb.rgbGreen == 255 &&
prgb.rgbRed == 255){
if(base == 0)
contador = base = y;
else
contador = y;
}
}
}

comprimento = contador - base + 1;

//desenha os limites do comprimento
SelectObject (hdc,CreatePen (PS_SOLID, 1, RGB (255, 0, 0))) ;

MoveToEx (hdc, 0 + ((cx - cxBitmap) / 2), base + ((cy - cyBitmap) / 2),NULL) ;

```

```

LineTo (hdc, xmax + ((cx - cxBitmap) / 2), base + ((cy - cyBitmap) / 2)) ;

MoveToEx (hdc, 0 + ((cx - cxBitmap) / 2), contador + ((cy - cyBitmap) /
2),NULL) ;
LineTo (hdc, xmax + ((cx - cxBitmap) / 2), contador + ((cy - cyBitmap) / 2)) ;

return comprimento;

}

/*-----
Função que mostra a retangularidade
-----*/

int MostraRetangularidade ( HDC hdc,double resultado)
{

static TCHAR szCurva[] = TEXT ("A Retangularidade é: "),
szNada[] = TEXT ("Essa imagem não é mono-cromática ou não tem
pontos brancos "),
buffer[70],buf[70],novo[20];

int i = 0;

char str[20];
sprintf(str,"%lf",resultado);

for(i = 0; i < 20;i ++)
szCurva[21 + i] = str[0 + i];

if(resultado == 0){
TextOut (hdc, 10, 20, buffer, wsprintf(buffer,szNada)) ;

}else{

TextOut (hdc, 10, 20, buf, wsprintf(buf,szCurva)) ;

}
return 1;
}

/*-----
Funções para o calculo da Exentricidade
--Momento1x
--Momento1y
--Momento2XY

```

```

--Momento2x
--Momento2y
-----*/

/*-----
Função que calcula o momento 1x
-----*/

double momento1X (HDIB hdib,int a){

    Cmassa centro;
    int area = a;
    double m1x = 0;

    centro = CalCentro2(hdib);

    m1x = centro.somax/area;

    return m1x;

}

/*-----
Função que calcula o momento 1Y
-----*/

double momento1Y (HDIB hdib,int a){

    Cmassa centro;
    int area = a;
    double m1y = 0;

    centro = CalCentro2(hdib);

    m1y = centro.somay/area;

    return m1y;

}

/*-----
Função que calcula o momento 2Y
-----*/

double momento2Y (HDIB hdib,int a){

    Cmassa centro;
    int area = a;
    double m1y = 0,m2y = 0;

    centro = CalCentro2(hdib);
    m1y = momento1Y(hdib,area);

```

```

        m2y = ( (centro.somay*centro.somay) - 2*m1y*centro.somay +
                (m1y*m1y) )/area;

        return m2y;
    }

/*-----
   Função que calcula o momento2X
   -----*/

double momento2X (HDIB hdib,int a){

    Cmassa centro;
    int area = a;
    double m1x = 0,m2x = 0;

    centro = CalCentro2(hdib);
    m1x = momento1X(hdib,area);

    m2x = ( (centro.somax*centro.somax) - 2*m1x*centro.somax +
            (m1x*m1x) )/area;

    return m2x;
}

/*-----
   Função que calcula o momento2XY
   -----*/

double momento2XY (HDIB hdib,int a){

    Cmassa centro;
    int area = a;
    double m1x = 0,m1y = 0,m2xy = 0;

    centro = CalCentro2(hdib);
    m1x = momento1X(hdib,area);
    m1y = momento1Y(hdib,area);

    m2xy = (double)(centro.multXY - m1x*centro.somay -
m1y*centro.somax + m1x*m1y)/area;

    return m2xy;
}

/*-----
   Função que calcula a Excentricidade

```

```

-----*/
double Excentricidade (HDIB hdib,int a){
    double ex = 0;
    double m2x = 0,m2y = 0,m2xy = 0;
    int area = a;

    m2x = momento2X(hdib,area);
    m2y = momento2Y(hdib,area);
    m2xy = momento2XY(hdib,area);

    ex = (4*3.1416)*(4*3.1416);
    ex = ex *(m2x - m2y)*(m2x - m2y) ;/*(m2x - m2y) ao quadrado
    ex = ex + 4*(m2xy*m2xy);
    ex = ex/(area*area);

    return ex;

}

```

```

/*-----
    Função que mostra a Excentricidade
-----*/

```

```

int MostraExcentricidade ( HDC hdc,double resultado)
{

    static TCHAR  szCurva[] = TEXT ("A Excentricidade é: "),
                 szNada[] = TEXT ("Essa imagem não é mono-cromática ou não tem
pontos brancos "),
                 buffer[70],buf[70],novo[20];

    int i = 0;

    char str[20];
    sprintf(str,"%lf",resultado);

    for(i = 0; i < 20;i ++)
        szCurva[21 + i] = str[0 + i];

    if(resultado == 0){
        TextOut (hdc, 10, 20, buffer, wsprintf(buffer,szNada)) ;

    }else{

        TextOut (hdc, 10, 20, buf, wsprintf(buf,szCurva)) ;
    }
}

```

```
}  
    return 1;  
}
```

9.2 Resumos estendidos publicados:

9.2.1 Apresentado no V JEPEX 2005

ANÁLISE DE PADRÕES DE COMPLEXIDADE DO PROCESSO DE VASCULARIZAÇÃO DA RETINA HUMANA.

Antônio José de Oliveira¹; Williams Thiago de Oliveira Azevedo²; Ana Carolina Bione Kunick³; Romildo de Albuquerque Nogueira⁴

Introdução

A quantificação de fenômenos por meio de modelos matemáticos e métodos estatísticos é uma prática estabelecida em diversos ramos da biologia. Modelos que visam quantificar a variação de forma e complexidade das estruturas têm sido usados na descrição de vários sistemas biológicos. No que diz respeito à medida da complexidade dos processos biológicos, a dimensão fractal tem sido usada como uma forma de parametrizar os diferentes padrões de complexidade encontrados na natureza. Neste trabalho enfocaremos somente a análise de padrões de complexidade do processo de vascularização da retina humana. A dimensão fractal será usada para parametrizar este processo.

Material e Métodos

Foram realizadas 30 retinografias de pacientes com idade entre 22 e 44 anos com acuidade visual de 6/6, sem doença ocular e com valor de ametropia não superior a 6 dioptrias utilizando-se um retinógrafo Canon. Todas as retinografias foram de 60 graus, com a fóvea centralizada e certificou-se disso fazendo com que os pacientes fixassem um alvo central. As retinografias foram segmentadas manualmente, usando-se uma rotina computacional desenvolvida em nosso laboratório, onde foram usados os programas Word e Paint da

¹ Mestrando em Biometria /UFRPE

² Graduando em Engenharia da Computação/ UFPE

³ Graduanda em Medicina Veterinária e Bolsista PIBIC-UFRPE

⁴ Orientador e Professor do DFMA/UFRPE

Microsoft. A segmentação consiste em extrair da imagem digitalizada do fundo de olho os vasos retinianos (Fig. 1 A). A segmentação foi realizada através do programa Word clicando-se sobre a imagem digitalizada, ao longo dos vasos retinianos ou de segmentos deles (Fig. 1B). Após todos os vasos retinianos serem segmentados a imagem do fundo de olho foi deletada, sendo coletada apenas a informação dos vasos segmentados (Fig 1C). Para obtenção de uma imagem binária com fundo em preto e os vasos segmentados em branco (Fig. 1 D), foi usado o programa Paint para realizar a inversão de cores. Este procedimento se faz necessário devido o programa Benoit™ 1.3 Fractal Analysis System, que foi usado para o cálculo da dimensão fractal da imagem segmentada dos vasos, operar com a imagem nesse formato. Após a obtenção da imagem segmentada foram testados diferentes métodos de cálculos de dimensões fractais para determinar-se qual a dimensão é mais adequada para o cálculo da vascularização da retina humana.

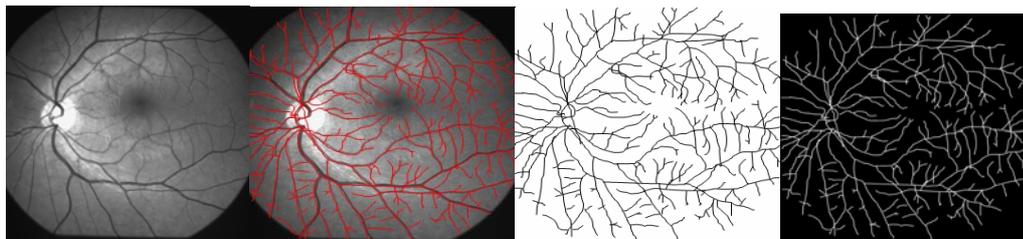


Figura 1: Diferentes etapas que a retinografia passa desde sua obtenção até formação da imagem binária. (A) imagem digitalizada do fundo do olho humano normal obtido através da retinografia; (B) imagem segmentada do fundo de olho; (C) imagem binária; (D) imagem binária do fundo de olho humano com inversão de cores que será utilizado pelo programa Benoit™ 1.3 Fractal Analysis System para calcular a dimensão fractal.

A dimensão fractal no método de contagem por caixas é obtida cobrindo-se o objeto fractal com $N(r)$ caixas que contenham pelo menos um ponto do objeto fractal. Repete-se o procedimento com caixas de diferentes tamanhos e traça-se um gráfico duplo log de $N(r)$ em função de r (lados das caixas). A inclinação desse gráfico com o sinal invertido é a dimensão de contagem por caixas, que pode ser definida, formalmente, através da seguinte expressão:

$$d = \lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \left[\frac{\log N(r + \varepsilon) - \log N(r)}{\log(r + \varepsilon) - \log(r)} \right]$$

A dimensão de massa-raio é obtida construindo-se círculos de diferentes raios centrado no centro de massa da região de maior densidade de pixels do

objeto fractal e calculando-se o número de pixels (massa) dentro de cada um desses círculos. Para um objeto fractal, a massa M (pixel) escala com o raio dos círculos através da seguinte expressão: $M \sim r^D$, onde M é a massa, r é o raio e D a dimensão de massa-raio.

A dimensão de informação é definida pela seguinte expressão:

$$d = \lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \left[\frac{S(r + \varepsilon) - S(r)}{\log(r + \varepsilon) - \log r} \right]$$

onde $S(r) = -\lim_{N \rightarrow \infty} \sum_{i=1}^{N(r)} m_i \log(m_i)$ é denominada entropia de Kolmogorov e

$m_i = MI / M$ onde, MI é o número de pontos na i^{th} caixa, M é o número total de pontos do objeto fractal e $N(r)$ é o número de caixas de lado r . Portanto, a dimensão de informação atribui pesos as caixas de tal maneira que as caixas que contêm um número maior de pontos pesam mais do que caixas com menos pontos. O cálculo da dimensão de informação é obtido através da inclinação de um gráfico da entropia de Kolmogorov em função do logaritmo dos lados das caixas usadas para cobrir o objeto fractal.

Resultados e Discussão

As dimensões fractais calculadas pelos três diferentes métodos mostraram os seguintes valores médios : $1,472 \pm 0,011$ ($n=30$) para dimensão de contagem por caixas; $1,555 \pm 0,016$ ($n=30$) para dimensão de informação e $1,688 \pm 0,064$ ($n=30$) para dimensão de massa-raio. A análise de variância e um teste post-hoc de Tukey mostraram que esses valores diferem significativamente entre si ($F=235,719$; $p=0,000$). É interessante observar que dependendo do tipo de dimensão fractal usado para descrever o processo de vascularização da retina humana, diferentes valores podem ser obtidos para este parâmetro. Isto sugere que o processo de vascularização da retina humana é um multifractal. Family et al. (1989) usaram os métodos de massa-raio e correlação para o cálculo da dimensão fractal da vascularização da retina humana e encontram por ambos os métodos valores aproximadamente iguais a 1,71, semelhante a dimensão fractal do DLA (difusão limitada por agregação). Mainster et al. (1990), usando dimensão de contagem por caixas encontraram para o padrão arterial da retina

humana um valor igual a $1,63 \pm 0,05$ e para o venoso $1,71 \pm 0,07$. As dimensões fractais tanto obtidas nesse trabalho como aquelas determinadas pelos autores citados reforçam a hipótese que os fatores angiogênicos que controlam a retina devem obedecer a um processo de difusão limitada por agregação, como sugerido por Family et al. (1989).

Conclusões

Dependendo do tipo de dimensão fractal usado para descrever o processo de vascularização da retina humana, diferentes valores podem ser obtidos para este parâmetro. Isto sugere que o processo de vascularização da retina humana é um multifractal.

Referências Bibliográficas.

1. FAMILY, F., MASTERS, R. B. and PLATT, D. E. **Fractal Pattern Formation in Human Retinal Vessels**. Physica D, 38 (1989) 98-103.
2. MAINSTER M. A., **The fractal properties of retinal vessels: Embryological and clinical implications**, Eye, 4 (1990) 235-241.

**9.2.2 Apresentado no V Encontro Regional de Matemática
Aplicada e Computacional**

PARAMETRIZANDO A VASCULARIZAÇÃO DA RETINA HUMANA

Kunicki, A.C.B.¹; Mendonça, M.B.M.²; Azevedo, W.T.O.³; Oliveira, A.J.⁴;
Nogueira, R.A.¹

¹Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, UFRPE

²Departamento de Oftalmologia, UFPE

³Centro de Informática, UFPE

⁴Mestrado em Biometria, UFRPE

Resumo: A dimensão fractal tem sido proposta na literatura como um método capaz de parametrizar a vascularização da retina. No entanto, este método ainda não foi aplicado na rotina clínica devido à necessidade de maiores investigações tanto no que diz respeito ao processo de segmentação da imagem do fundo de olho como também ao tipo de dimensão fractal mais adequado para descrever esse processo vascular. Este trabalho, que utiliza como modelo experimental retinografias em humanos, tem como objetivos: i) desenvolver um método semi-automático para isolar os vasos retinianos do restante da imagem do fundo de olho (segmentação dos vasos); ii) investigar qual o tipo de dimensão fractal é mais adequado para descrever o processo de vascularização da retina e iii) definir um padrão de normalidade para a dimensão fractal da vascularização da retina humana. Foram utilizadas 30 retinografias de pacientes normais (sem doença ocular). As imagens do fundo de olho foram segmentadas manualmente, usando-se os programas Word e Paint da Microsoft. Após a segmentação dos vasos retinianos, o restante da imagem é deletada sendo coletada apenas a informação dos vasos numa imagem binária que será utilizada, usando-se o programa Benoit™ 1.3 Fractal Analysis System, para o cálculo das dimensões fractal de box-counting, informação e massa-raio. Para o cálculo desta última dimensão se faz

necessário definir a região da imagem com maior densidade de vasos e isto foi realizado através de um programa desenvolvido em nosso laboratório. As dimensões fractais das imagens segmentadas do fundo de olho foram as seguintes: $1,472 \pm 0,011$ (contagem por caixas (box-counting), $n = 30$), $1,555 \pm 0,016$ (informação, $n = 30$) e $1,688 \pm 0,064$ (massa-raio, $n = 30$), que diferiram significativamente ($F = 235,719$; $p = 0,000$). Após a realização do teste Post Hoc de Tukey pode-se observar que as três dimensões diferiram significativamente entre si. Portanto, dependendo do método utilizado para calcular a dimensão fractal da vascularização da retina diferentes valores podem ser obtidos, sugerindo que o padrão de vascularização da retina humana é um multifractal. Investigar qual método de cálculo da dimensão fractal é mais adequado é de grande importância para auxiliar no diagnóstico, prognóstico ou mesmo planejamento e avaliação terapêutica das doenças vasculares retinianas.

1.0 INTRODUÇÃO

A retina, camada interna do globo ocular, possui um bem desenvolvido plexo vascular. Esta intensa vascularização é necessária devido a sua elevada atividade celular que requer grande quantidade de oxigênio. Kretzer *et al.* (1984, 1986) e Kretzer & Hittner (1988) sugerem que o desenvolvimento dos vasos sangüíneos deve-se a liberação e difusão de fatores angiogênicos na retina. Esta hipótese é reforçada pela aplicação da análise fractal, quando mostra que o valor da dimensão fractal da vascularização é semelhante ao do processo de difusão limitada por agregação (DLA), ou seja, $D \approx 1.7$ (FAMILY *et al.*, 1989; MASTERS, 2004). Por este motivo, o DLA tem sido utilizado como um modelo para o desenvolvimento de estruturas fractais como a vascularização da retina humana.

Objetos ou processos fractais caracterizam-se por suas propriedades que são: i) a auto-similaridade, a qual significa que partes de um objeto ou processo parece com o objeto ou processo todo; ii) a dependência de escala (scaling), que significa dizer que a medida da grandeza depende da escala na qual foi medida; iii) dimensão fractal, a qual provê uma descrição quantitativa da auto-similaridade e dependência de escala e as iv) propriedades

estatísticas anômalas das grandezas fractais (MANDELBROT, 1983; BASSINGTHWAIGHT *et al.*, 1994).

Devido à distribuição bastante complexa da vascularização da retina, uma descrição através da geometria fractal deste processo é de grande interesse no auxílio do diagnóstico e prognóstico de várias doenças que acometem a vascularização da retina. Avakian *et al.* (2002) compararam a dimensão fractal de pacientes normais e com retinopatia diabética não proliferativa (NPDR) pelo método de contagem por caixas (box-counting). A análise foi realizada por região e verificou-se que existe diferença significativa entre a região macular normal e NPDR, com dimensões fractais, respectivamente iguais a $1,46 \pm 0,02$ e $1,41 \pm 0,03$. Não se observaram diferenças significativas entre a região paramacular normal e NPDR e também entre toda região da retina normal e NPDR. Daxer (1993), usando o método massa-raio, estudou a retinopatia diabética proliferativa e encontrou uma dimensão fractal com média e desvio padrão de $1,85 \pm 0,06$, em indivíduos com neovascularização próxima ao disco óptico.

Neste trabalho foram aplicados os métodos de contagem por caixas, de informação e de massa-raio, à imagem segmentada dos vasos retinianos visando investigar qual método mais adequado para descrever esse processo vascular e determinado um padrão de normalidade para a dimensão fractal da vascularização da retina humana.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Técnica utilizada para obtenção da retinografia

Foram realizadas 30 retinografias de pacientes com idade entre 22 e 44 anos com acuidade visual de 6/6, sem doença ocular e com valor de ametropia não superior a 6 dioptrias utilizando-se um retinógrafo Canon. Todas as retinografias foram de 60 graus, com a fóvea centralizada e certificou-se disso fazendo com que os pacientes fixassem um alvo central. As imagens obtidas foram selecionadas com o uso de luz anerita e armazenadas no computador em escala de cinza de 8 bits com um tamanho de 936 x 936 pixels (figura 1.a).

3.2 Método Computacional

As retinografias foram segmentadas manualmente, usando-se uma rotina computacional desenvolvida em nosso laboratório, onde foram usados os programas Word e Paint da Microsoft. A segmentação consiste em extrair da imagem digitalizada do fundo de olho os vasos retinianos (ARAÚJO *et al.*, 2003). A segmentação foi realizada através do programa Word clicando-se sobre a imagem digitalizada, ao longo dos vasos retinianos ou de segmentos deles (figura 1.b). Após todos os vasos retinianos serem segmentados a imagem do fundo do olho foi deletada, sendo coletada apenas a informação dos vasos segmentados (figura 1.c). Para obtenção de uma imagem binária com fundo em preto e os vasos segmentados em branco (figura 1.d), foi usado o programa Paint para realizar a inversão de cores. Este procedimento se faz necessário devido o programa Benoit™ 1.3 Fractal Analysis System, que foi usado para o cálculo da dimensão fractal da imagem segmentada dos vasos, operar com a imagem nesse formato. Após a obtenção da imagem segmentada foram testados diferentes métodos de cálculos de dimensões fractais para determinar-se qual a dimensão é mais adequada para o cálculo da vascularização da retina humana.

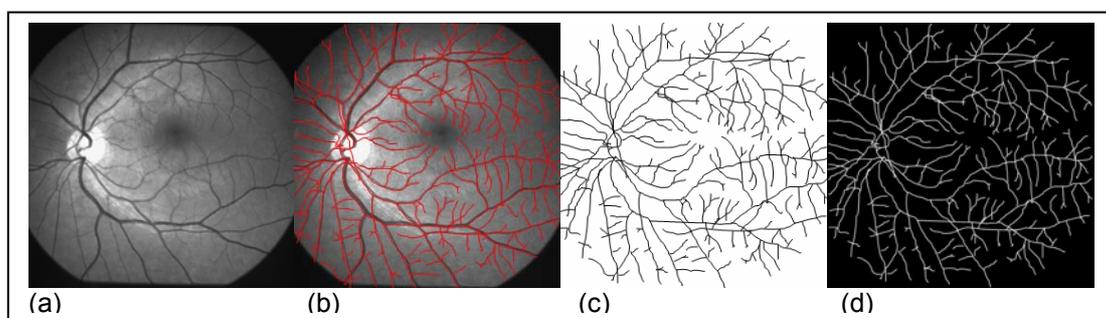


Figura 1: Diferentes etapas que a retinografia passa desde sua obtenção até formação da imagem binária. (a) imagem digitalizada do fundo do olho humano normal obtido através da retinografia; (b) imagem segmentada do fundo de olho; (c) imagem binária; (d) imagem binária do fundo de olho humano com inversão de cores que será utilizado pelo programa Benoit™ 1.3 Fractal Analysis System para calcular a dimensão fractal.

3.3 Método Teórico (Dimensão Fractal)

O método de contagem por caixas é o mais utilizado para o cálculo da dimensão fractal. Este método é obtido cobrindo-se o objeto fractal com $N(r)$

caixas que contenham pelo menos um ponto do objeto fractal. Repete-se o procedimento com caixas de diferentes tamanhos e traça-se um gráfico duplo log de $N(r)$ em função de r (lados das caixas). A inclinação desse gráfico com o sinal invertido é a dimensão de contagem por caixas, que pode ser definida, formalmente, através da seguinte expressão:

$$d = \lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \left[\frac{\log N(r + \varepsilon) - \log N(r)}{\log(r + \varepsilon) - \log(r)} \right]$$

A dimensão de massa-raio é obtida cobrindo-se o fractal com círculos de diferentes raios. Um pixel pertencente à estrutura é escolhido e a partir dele círculos de raio r são traçados ao longo do fractal. Em seguida, calcula-se o número total de pixels para cada círculo de raio r e traça-se o gráfico do logaritmo do número médio de pixels dentro de cada círculo pelos logaritmos dos diferentes raios dos círculos utilizados para cobrir o objeto fractal. A inclinação desse gráfico é a dimensão de massa-raio. Quando o objeto fractal tem alguma simetria radial, como ocorre com o processo de vascularização da retina, pode-se calcular a dimensão de massa-raio de maneira mais simples, construindo-se círculos de diferentes raios centrado no centro de massa da região de maior densidade de pixels do objeto fractal e calculando-se o número de pixels (massa) dentro de cada um desses círculos. Para um objeto fractal, a massa M (pixel) escala com o raio dos círculos através da seguinte expressão: $M \sim r^D$, onde M é a massa, r é o raio e D a dimensão de massa-raio (VICSEK, 1991).

A dimensão de informação é definida pela seguinte expressão:

$$d = \lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \left[\frac{(S(r + \varepsilon) - S(r))}{\log(r + \varepsilon) - \log r} \right]$$

onde $S(r) = -\lim_{N \rightarrow \infty} \sum_{i=1}^{N(d)} m_i \log(m_i)$ é denominada entropia de Kolmogorov e $m_i = MI / M$, onde, N é o número de caixas, MI é o número de pontos na i^{th} caixa e M é o número total de pontos do objeto fractal. Portanto, a dimensão de informação atribui pesos às caixas de tal maneira que aquelas que contêm um número maior de pontos pesam mais do que caixas com menos pontos. O

cálculo da dimensão de informação é obtido através da inclinação de um gráfico da entropia de Kolmogorov em função do logaritmo dos lados das caixas usadas para cobrir o objeto fractal.

3.4 Análise Estatística

Os dados foram analisados utilizando-se o software Statistica 5.5. Inicialmente foi utilizado o teste de Shapiro – Wilks para testar a normalidade da distribuição de probabilidades dos valores das dimensões fractais. O histograma que mostra esta distribuição foi obtido a partir do software Origin 5.0. Foram utilizados a análise de variância e um teste Post- Hoc de Tukey para verificar se as dimensões fractais de contagem por caixas, informação e massa-raio diferiam significativamente entre si.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diferentes métodos para o cálculo da dimensão fractal da vascularização da retina de humana tem sido sugerido na literatura especializada, entre eles podem-se citar os métodos de contagem por caixas, massa - raio e correlação (FAMILY *et al.*, 1989; MASTERS, 1994; MISSON *et al.*, 1992 ; LANDINI *et al.*, 1993; MASTERS, 2004). Neste trabalho, foram usados os métodos de contagem por caixas, de massa-raio e de informação visando definir qual o método mais adequado para o cálculo da dimensão fractal da vascularização da retina humana.

Os histogramas (Figuras 2.A, 2.B, 2.C) mostram que os valores para dimensões fractais da vascularização da retina humana, obtidos pelos três métodos, seguem distribuições com as características de uma curva normal. O teste de Shapiro-Wilks mostrou que as distribuições das dimensões de contagem por caixas, informação e massa-raio seguem uma curva normal com os valores de probabilidades iguais: 60,15%, 58,97%, 80,53% respectivamente. A análise de variância e um teste Post Hoc de Tukey mostraram que os valores médios das dimensões fractais de contagem por caixas ($1,472 \pm 0,011$, $n = 30$) informação ($1,555 \pm 0,016$, $n = 30$) e massa-raio ($1,688 \pm 0,064$, $n = 30$) diferem significativamente entre si ($F = 235,719$; $p = 0,000$). Este resultado mostra que dependendo do tipo de dimensão fractal utilizado para descrever o

processo de vascularização da retina, diferentes valores pode ser obtidos para este parâmetro. Isto sugere que o processo de vascularização da retina humana é um multifractal.

É interessante observar em nosso estudo que dentre os métodos avaliados para calcular a dimensão fractal da vascularização da retina humana, o método de massa-raio forneceu um valor mais próximo ao da dimensão do DLA ≈ 1.7 (FAMILY *et al.*, 1989). No entanto, deve-se esclarecer que num DLA muito denso é esperado que os cálculos das dimensões fractais pelos três métodos devem convergir para um mesmo valor. Portanto, como a vascularização da retina não é um processo suficientemente denso para que os três métodos possam ser aplicados indiferentemente é importante a escolha do método mais adequado para o cálculo dessa estrutura fractal.. Anteriormente, Family *et al.* (1989) utilizaram os métodos de massa-raio ($D = 1,71 \pm 0,07$) e correlação ($D = 1,72 \pm 0,03$), porém não observaram qualquer diferença significativa entre os resultados obtidos pelos dois métodos. Mainster *et al.* (1990), usando a dimensão de contagem por caixas, mostraram que os padrões arteriais e venosos da retina humana tem dimensões fractais de $1,63 \pm 0,05$ e $1,71 \pm 0,07$, respectivamente, consistente com a dimensão do DLA. Estas informações reforçam a hipótese que fatores que controlam a angiogênese retiniana devem obedecer a um processo de difusão limitada por agregação, como sugerido por Family *et al.* (1989) e Masters *et al.* (1989). Araújo *et al.* (2004) calcularam a dimensão fractal do DLA pelo método de contagem por caixas (1.464 ± 0.011) e raio de giração (1.722 ± 0.057). Como o método raio de giração apresentou um valor próximo aquele obtido para um DLA, este método foi utilizado para calcular a dimensão fractal da vascularização da retina de cães normais e sua dimensão foi 1.752 ± 0.119 . É interessante observar que mesmo na retina do cão, que tem características vasculares diferentes da retina humana, as dimensões fractais das duas estruturas são semelhantes, sugerindo que os processos difusionais de fatores de crescimentos vasculares nas retinas das duas espécies devem ocorrer de maneiras semelhantes.

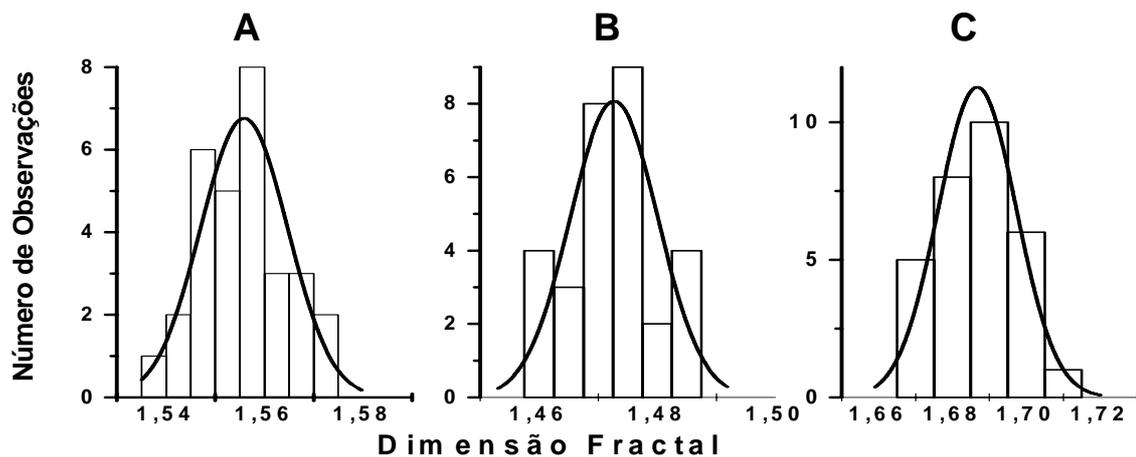


Figura 2: Distribuição normal das dimensões fractais de informação (A), contagem por caixas (B) e massa-raio das 30 imagens segmentadas do fundo de olho humano.

CONCLUSÕES:

1. O método manual desenvolvido nesse trabalho para fazer a segmentação dos vasos a partir das retinografias permitiu a obtenção de uma imagem binária fidedigna à imagem real. Isto é importante quando se pretende definir um padrão de normalidade para a dimensão fractal da vascularização da retina humana.
2. Dependendo do método utilizado para calcular a dimensão fractal da vascularização da retina, diferentes valores podem ser obtidos. Isto sugere que o padrão de vascularização da retina humana é um multifractal.
3. Um padrão de normalidade foi definido para vascularização da retina humana, através da construção de uma distribuição gaussiana de valor médio e desvio padrão para dimensão fractal de massa-raio, respectivamente, iguais a 1,688 e 0,064.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AVAKIAN, A. et al. Fractal analysis of region-based change in the normal and non-proliferative diabetic retina. **Current Eye Research**, England , v. 24, p. 274-280, 2002.
2. ARAÚJO et al. Análise Fractal da vascularização da retina do cão. In: **IV Simpósio de Pesquisa e Pós-Graduação da UFRPE**, Recife, Imprensa Universitária, 2003.
3. ARAÚJO, L. S. **Análise fractal da vascularização da retina de cães com visão normal**. 2004. 35 p. Tese (Mestrado em Biometria) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
4. BASSINTHWAIGHT, J. B.; LIEBOVITCH, L. S.; WEST, J. B. **Fractal physiology**. New York: Oxford University Press, 1994. p. 11-42.
5. DAXER, A. Characterisation of the neovascularisation process in diabetic retinopathy by means of fractal geometry: diagnostic implications. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, Berlin, v. 231, p. 681-686, 1993.
6. FAMILY, F.; MASTERS, R. B.; PLATT, D. E. Fractal Pattern Formation in Human Retinal Vessels. **Physica D**, Netherlands, v. 38, p. 98-103, 1989.
7. KRETZER, F. L. et al. Vitamin E protects against retinopathy of prematurity through action on spindle cells, **Nature**, England, v. 309, n. 5971, 1984, p. 793-795.
8. KRETZER, F. L.; MCPHERSON, A. R.; HITTNER, H. M. An interpretation of retinopathy of prematurity in terms of spindle cells: relationship to vitamin E prophylaxis and cryotherapy, **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, Berlin, v. 224, n. 3, 1986, p. 205-214.
9. KRETZER, F. L.; HITTNER, H. M. Retinopathy of prematurity: clinical implications of retinal development, **Archives of Disease in Childhood**., England, v. 63, 1988, p. 1151- 1167.
10. LANDINI G.; MISSON G. P.; MURRAY P. I. Fractal analysis of the normal human retinal fluorescein angiogram. **Current Eye Research**, England ,v. 12, p. 23-27, 1993.

11. MANDELBROT, B. **The fractal geometry of nature**. Nova York: W.H. Freeman, 1983. 468 p.
12. MAINSTER, M.A. The fractal properties of retinal vessels: Embryological and clinical implications, **Eye**, London, v. 4, 1990, p. 235-241.
13. MASTERS, B.R.; PLATT, D. F. Development of human retinal vessels: a fractal analysis. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 30, 1989, p. 391 (Suppl.).
14. MASTERS, B. R. Fractal analysis of normal human retinal blood vessels, **Fractals**, Singapore, v. 2, 1994, p. 103-110.
15. MASTERS, B. R. Fractal analysis of the vascular tree in the human retina, **Annual Review of Biomedical Engineering**, United States, v.6, 2004, p. 427 – 452.
16. MISSON, G. P.; LANDINI, G.; MURRAY, P. I. Fractals and ophthalmology, **Lancet**, England, v. 339, 1992, p. 872.
17. VICSEK, T., **Fractal Growth Phenomen**, World Scientific, Singapore, 1991. p. 81-82.